



**You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Oddziaływanie wybranych czynników chemicznych na właściwości biomechaniczne oraz potencjał do reendotelializacji tkanek kolagenowych przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkankowej

Author: Małgorzata Morenc

Citation style: Morenc, Małgorzata. (2018). Oddziaływanie wybranych czynników chemicznych na właściwości biomechaniczne oraz potencjał do reendotelializacji tkanek kolagenowych przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkankowej. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

**Oddziaływanie wybranych czynników chemicznych na
właściwości biomechaniczne oraz potencjał do reendotelializacji
tkanek kolagenowych przeznaczonych do zastosowań
w inżynierii tkankowej**

mgr Małgorzata Morenc

Rozprawa na stopień doktora wykonana
w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii
pod kierunkiem
dr hab. Grażyny Wilczek

-Katowice 2018-

*Praca doktorska wykonana w ramach Studiów Doktoranckich
Advanced Methods in Biotechnology and Biodiversity
oraz w ramach realizowanego w Fundacji Rozwoju Kardiologii im. prof.
Zbigniewa Religi w Zabrze projektu pn.: „Opracowanie innowacyjnej bioaktywnej
protezy zastawki serca”. Projekt realizowany był w ramach Programu Badań
Stosowanych w ścieżce A, zgodnie z umową PBS3/A7/17/2015 finansowaną ze
środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.
Badania do pracy zostały wykonane w Pracowni Bioinżynierii w Fundacji Rozwoju
Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze
oraz w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii, Wydziału Biologii i Ochrony
Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego.*

Podziękowania

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej Promotor
Pani dr hab. Grażynie Wilczek
za nieocenioną pomoc w trakcie przygotowania niniejszej pracy doktorskiej.
Poświęcony czas, życzliwość, a także cierpliwość oraz pomoc w jasnym
formułowaniu myśli naukowej.*

*Podziękowania składam również
Panu dr hab. n. med. Piotrowi Wilczkowi, Profesorowi IPS
Dziękuję za umożliwienie wykonywania badań w Pracowni Bioinżynierii
w Fundacji rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi.
Inspirację do badań oraz kreatywne podejście w poszukiwaniu
rozwiązań problemów badawczych i motywację do krytycznego
spojrzenia na problematykę badawczą.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam
Pracownikom Pracowni Bioinżynierii w Fundacji
rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi
dr inż. Aleksandrze Niemiec-Cyganek, dr n. med. Annie Barańskiej- Lesiak,
mgr Anetecie Samotus, mgr Karolinie Jendryczko, mgr Katarzynie Jesse,
mgr Martynie Marcisz, mgr Paulnie Gach
za pomoc w zakresie technik eksperymentalnych oraz
prawdziwie naukową atmosferę w pracy.*

*Chciałabym również podziękować rodzicom, siostrze oraz przyjaciołom,
za nigdy niegasnącą wiarę we mnie oraz motywację i wsparcie, które okazali mi
w najpotrzebniejszych dla mnie momentach.*

Spis treści

1	Wstęp	8
1.1	Wprowadzenie	8
1.2	Funkcja i makrostruktura zastawek serca	9
1.3	Morfologia zastawki pnia płucnego	9
1.4	Komponenta komórkowa zastawki płucnej	12
1.5	Praca zastawki serca w warunkach fizjologicznych	14
1.6	Wady zastawek serca i ich przyczyny	16
1.7	Komercyjnie dostępne protezy zastawek serca i ich ograniczenia	17
1.7.1	Protezy mechaniczne	17
1.7.2	Protezy biologiczne	18
1.8	Metody konserwacji bioprotez zastawek serca (BHV)	20
1.9	Aldehyd glutarowy jako czynnik sieciujący białka	20
1.10	Kalcyfikacja jako główne organicznie komercyjnie stosowanych bioprotez	22
1.11	Alternatywy dla aldehydu glutarowego	23
1.12	Inżynieria tkankowa – w poszukiwaniu nowych rozwiązań	24
1.13	Rusztowania syntetyczne	25
1.14	Rusztowania biologiczne	26
1.15	Metody decelularyzacji	27
1.15.1	Detergenty niejonowe	28
1.15.2	Detergenty jonowe	28
1.15.3	Detergenty amfolityczne	29
1.15.4	Kwasy i zasady	29
1.15.5	Alkohole	29
1.15.6	Enzymy	30
1.15.7	Czynniki chelatujące	30
1.16	Zasiedlanie rusztowań biologicznych komórkami	31
2	Cele badań i hipotezy badawcze	35

2.1	Uzasadnienie tematu badań oraz cele badawcze.....	35
2.2	Hipotezy badawcze.....	37
3	Materiały i metody	38
3.1	Pobranie i przygotowanie materiału do badań	38
3.2	Sterylizacja materiału biologicznego	39
3.3	Przygotowanie decelularnych matryc płatków i naczyń zastawki pnia płucnego	40
3.4	Konserwacja chemiczna decelularnych matryc płatków i naczyń zastawki płucnej roztworami aldehydu glutarowego (GA).....	40
3.5	Przygotowanie materiału natywnego.....	41
3.6	Kwalifikacja histologiczna materiału badawczego.	41
3.7	Ocena wybranych właściwości morfologicznych decelularnych matryc.....	41
3.7.1	Przygotowanie preparatów histologicznych do barwienia	41
3.7.2	Barwienie hematoksyliną i eozyną	42
3.7.3	Barwienie metodą Massona	42
3.7.4	Barwienie metodą Verhoeff-van Giesona (VEG).....	43
3.7.5	Barwienie z użyciem błękitu alcjanowego (ALB).....	45
3.8	Ocena stopnia kalcyfikacji matryc w teście <i>in vitro</i>	46
3.8.1	Obrazowanie złogów wapnia za pomocą barwienia czerwienią alizarynową S	46
3.9	Badanie oporności decelularnych matryc modyfikowanych aldehydem glutarowym na degradację enzymatyczną z zastosowaniem kolagenazy II	48
3.10	Hodowla komórek śródbłónka.....	48
3.11	Ocena cytotoksyczności aldehydu glutarowego na komórki endotelialne - badanie cytotoksyczności pośredniej z ekstraktów.	49
3.11.1	Sporządzenie ekstraktów.....	49
3.11.2	Hodowla komórek HUVEC z ekstraktami.....	50
3.11.3	Badanie odpowiedzi komórkowej na ekstrakty modyfikowanych tkanek ...	50
3.11.4	Ocena cytoszkieletu komórek śródbłónka traktowanych ekstraktami tkankowymi.....	51

3.11.5	Badanie żywotności komórek śródbłonka użyciem techniki cytometrii przepływowej.....	51
3.12	Zasiedlanie matryc komórkami śródbłonka – ocena cytotoksyczności bezpośredniej.....	52
3.12.1	Barwienie jodkiem propidyny (PI) i diocetanem fluoresceiny (FDA)	54
3.13	Ocena wybranych właściwości mechanicznych decelularnych matryc traktowanych aldehydem glutarowym	55
3.13.1	Przygotowanie próbek do testów mechanicznych.....	55
3.13.2	Wykonanie statycznej próby rozciągania.....	56
3.13.3	Obliczanie wartości naprężenia w próbie rozciągania	57
3.13.4	Obliczanie odkształcenia względnego w punkcie maksymalnego naprężenia próbki.	57
3.13.5	Pomiar modułu elastyczności.....	58
3.13.6	Wyznaczanie wytrzymałości na rozciąganie.....	60
3.13.7	Wyznaczanie energii w punkcie maksymalnego naprężenia.....	61
3.13.8	Wyznaczanie wartości naprężenia w momencie zerwania próbki.....	62
3.14	Analiza statystyczna wyników.....	63
4	Wyniki	68
4.1	Wpływ procesu decelularyzacji na wybrane właściwości morfologiczne bezkomórkowych matryc zastawki płucnej.....	68
4.1.1	Ocena efektywności procesu decelularyzacji oraz jego wpływ na strukturę włókien białek macierzy zewnątrzkomórkowej badanych tkanek	68
4.2	Ocena wpływu sieciowania tkanek z użyciem aldehydu glutarowego na stopień degradacji enzymatycznej z zastosowaniem kolagenazy II	74
4.3	Kalcyfikacja.....	79
4.4	Ocena cytotoksyczności czynników stosowanych do modyfikacji decelularnych tkanek w stosunku do komórek śródbłonka.....	82
4.5	Ocena wybranych stężeń aldehydu glutarowego na komórki śródbłonka - badanie cytotoksyczności metodą pośrednią z zastosowaniem ekstraktów	87
4.5.1	Analiza cytometryczna żywotności komórek śródbłonka hodowanych w obecności ekstraktów tkankowych	87

4.5.2	Ocena morfologii komórek poddanych działaniu ekstraktów tkankowych	89
4.5.3	Wpływ ekstraktów tkankowych na sekrecję cytokin przez komórki śródbłónka	91
4.6	Ocena właściwości mechanicznych decelularnych płatków zastawek serca i naczyń zastawek płucnych sieciowanych GA	93
4.6.1	Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na ich odkształcenie względne w punkcie maksymalnego naprężenia próbki	93
4.6.2	Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na moduł elastyczności (MY) i moduł sieczny (Ms)	94
4.6.3	Wytrzymałość na rozciąganie	98
4.6.4	Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na energię w punkcie maksymalnego naprężenia	100
4.6.5	Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na wartość naprężenia w momencie zrywania próbki	103
4.6.6	Analiza czynnikowa udziału zastosowanych modyfikacji tkanki na właściwości mechaniczne zastawki płucnej	105
5	Dyskusja	107
5.1	Wpływu decelularyzacji tkanki oraz sieciowania aldehydem glutarowym na jej strukturę ECM i właściwości mechaniczne	107
5.2	Zdolność zasiedlania komórkami śródbłónka decelularnych rusztowań modyfikowanych GA	115
5.3	Podsumowanie	119
6	Wnioski	120
7	Bibliografia	122
8	Streszczenie	142
9	Spis rycin	144
10	Spis tabel	152
11	Wykaz skrótów użytych w pracy	153

1 WSTĘP

1.1 Wprowadzenie

Serce jest narządem o dużym stopniu skomplikowania układu włókien mięśniowych. Jego rola związana jest z kształtowaniem przepływu krwi w układzie naczyniowym, co możliwe jest dzięki czynności skurczowej mięśnia sercowego (Ferro i wsp. 2018). Jako pierwszy funkcję serca opisał w 1628 r. William Harvey w swoim dziele "*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*". Większość ówczesnych Harveyowi lekarzy uważało, iż za ruch krwi w naczyniach odpowiedzialne są płuca. Harvey natomiast zaobserwował, że krew nie cofa się w jamach serca, co wskazywało na obecność zastawek w mięśniu sercowym (Besterman 2009). W tej wyrafinowanej dynamice, umożliwiającej przepływ krwi w sposób jednokierunkowy kluczową rolę odgrywają cztery zastawki serca: mitralna, trójdzielna, aortalna i pnia płucnego. Podczas średniej długości życia człowieka zastawki serca otwierają się i zamykają ponad trzy miliardy razy, co sprawia, że w warunkach spoczynku lub aktywności fizycznej może przepływać przez nie od 3 do 5 L krwi na minutę (Misfeld i Sievers 2007). W stanach patologicznych związanych z pracą zastawek serca ilość ta zmienia się istotnie. Nieprawidłowa praca zastawki serca może być skutkiem zwężenia światła przepływu krwi lub niedomykalności płatków, która prowadzi do wstecznego ruchu krwi. Wady te mają tendencję do pogłębiania się i zaburzenia prawidłowej pracy serca (Hinton i Yutzey 2011). Powodem tych defektów może być zwapnienie, zwłóknienie, perforacja, pęknięcie lub rozciągnięcie płatków zastawki, będących skutkiem przebytych chorób na przykład gorączki reumatycznej lub wad genetycznych manifestujących się w nieprawidłowej budowie zastawki. Ponieważ tkanki zastawek serca przy dużych uszkodzeniach nie mogą się regenerować spontanicznie, wady te w zależności od stopnia zaawansowania choroby na ogół wymagają interwencji chirurgicznej (Rabkin-Aikawa i wsp. 2005). Rocznie na świecie wykonywanych jest około 280 000 zabiegów chirurgicznych implantacji protez zastawek serca, a zgodnie z przewidywaniami liczba ta do 2050 r. zwiększy się trzykrotnie. Zastosowanie mają protezy biologiczne oraz mechaniczne, a ich wybór zależny jest od wskazań klinicznych (Parvin Nejad i wsp. 2016). Pomimo, iż jakość i długość życia pacjentów leczonych dostępnymi metodami chirurgicznej wymiany zastawki wzrasta, rozwiązania te wciąż posiadają wiele ograniczeń, które pozostają wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Biorąc pod uwagę powyższy fakt wciąż poszukuje się nowych rozwiązań pozwalających na optymalizację metod wytwarzania protez sercowych, dlatego obiecującym wydaje się rozwój dziedziny wiedzy jaką jest inżynieria tkankowa. Prace badawcze prowadzone w zakresie tworzenia analogów tkankowych mają charakter nowatorski, a zastosowania kliniczne tego typu są

nieliczne. Niejednoznaczne wyniki publikowanych dotychczas prac również skłaniają do kontynuowania badań w tej dziedzinie.

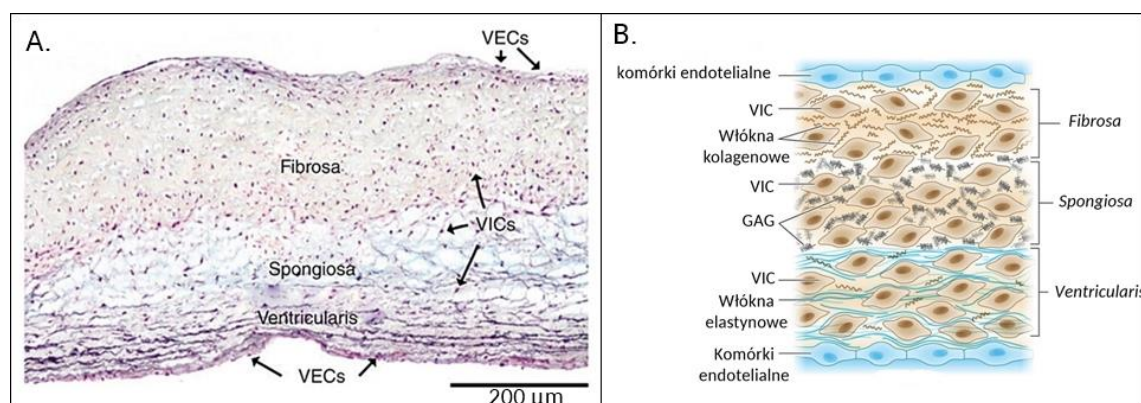
1.2 Funkcja i makrostruktura zastawek serca.

Zastawki przedsionkowo-komorowe (mitralna i trójdzielna) oraz zastawka aorty i pnia płucnego usytuowane są w pierścieniach włóknistych serca, zbudowanych z gęsto upakowanych włókien kolagenowych przymocowanych do mięśnia sercowego. Główna funkcja zastawek to ukierunkowanie przepływu krwi pomiędzy jamami serca. Podczas skurczu komór zastawki przedsionkowo-komorowe zamykają się, dzięki czemu krew nie wraca do naczyń tętniczych tylko wpływa do przedsionków. Podczas rozkurczu zastawki przedsionkowo-komorowe otwierają się, dzięki czemu krew swobodnie napływa z przedsionków do komór. Elementem budującym zastawki są płatki zastawek. Znajdująca się w prawym ujściu żylnym zastawka trójdzielna zbudowana jest z trzech płatków: przedniego, tylnego i przyśrodkowego, z kolei zastawka mitralna, zlokalizowana w lewym ujściu żylnym, utworzona jest przez płatek przedni i tylny. Do wolnych brzegów każdego płatka przyłączone są struny ścięgna, beleczki mięśniowe i mięśnie brodawkowate. Zastawki aorty i pnia płucnego są kształtu półksiężycowego. Środek wolnego brzegu płatka jest wzmocniony grudką płatka (łac. *nodule*) półksiężycowego. Wzdłuż wolnego brzegu płatka biegnie obłaczek (łac. *lunula*), a pomiędzy nimi znajduje się spoidło międzypłatkowe (łac. *commisure*) (Bateman i wsp. 2013). Choć każda z zastawek ma specyficzną dla siebie hemodynamikę i różnią się między sobą morfologicznie, wspólnymi cechami warunkującymi ich prawidłową funkcję są: zdolność adaptacji do warunków środowiska, żywotność i wytrzymałość mechaniczna. W niniejszej pracy uwagę skupiono głównie na budowie i funkcji zastawki pnia płucnego, która stanowiła materiał modelowy w przeprowadzonych badaniach.

1.3 Morfologia zastawki pnia płucnego

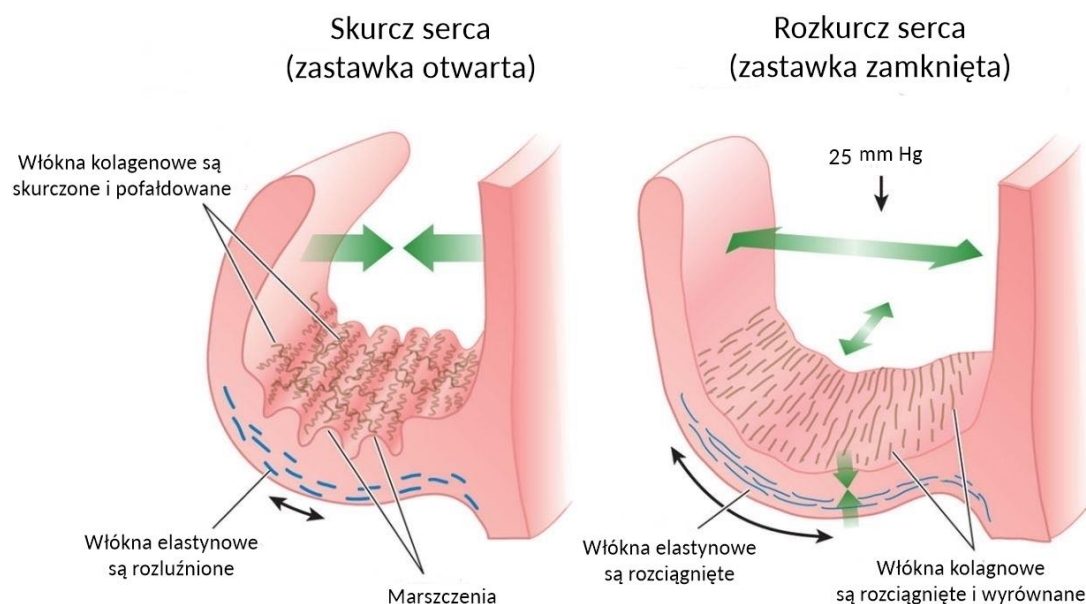
Szybka reakcja, wysoce skoordynowane ruchy oraz długotrwała wytrzymałość zastawki płucnej warunkowana jest jej makro-, mikro- i ultra-strukturą. Podobnie jak wszystkie zastawki, zastawka płucna ma mikroskopowo niejednorodną budowę. Powierzchnia mająca bezpośredni kontakt z krwią pokryta jest pojedynczą, jednorodną powłoką komórek śródbłonna (ang. endothelial cells – EC). Komórki znajdujące się w głębszych warstwach pomiędzy elementami macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix – ECM) stanowią komórki interstycjalne. Posiadają one zróżnicowany fenotyp nawiązujący do fibroblastów, miofibroblastów oraz posiadających zdolności kurczliwe komórek mięśni gładkich. Macierz zewnątrzkomórkowa zastawki składa się w przeważającej ilości z kolagenu (głównie typu I, III i V), elastyny oraz glikozaminoglikanów (GAG) (Rabkin-Aikawa

i wsp. 2005; Schoen 2016). W mikroskopowym obrazie przekroju poprzecznego przez płatkę zastawki płucnej obserwuje się warstwowy wzór architektoniczny, który obejmuje trzy główne części zrębu łącznotkankowego: komorową (łac. *lamina ventricularis*), gąbczastą (łac. *lamina spongiosa*) i włóknistą (łac. *lamina fibrosa*) (Ryc. 1-1) (Schoen 2012; Bateman i wsp. 2013; Usprech i wsp. 2016). Od strony komory serca znajduje się blaszka komorowa, złożona z promieniowo ułożonych włókien elastynowych i nielicznych cienkich



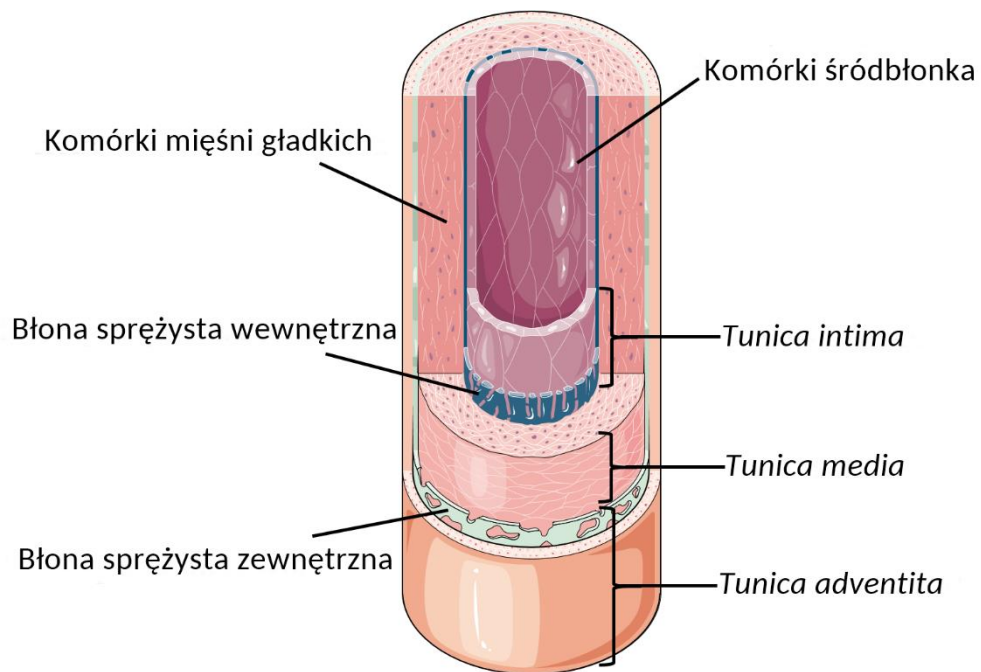
Ryc. 1-1 Reprezentatywne zdjęcie przekroju poprzecznego płatką zastawki aortalnej, po wybarwieniu pentachromem Movat'a, kolagen – kolor żółty, elastyna i jądra komórkowe – kolor purpurowy, glikozaminoglikany – kolor niebieski (zdjęcie zaczerpnięte z. Usprech i wsp. 2016) B. Schemat przekroju poprzecznego płatką zastawek płucnej i aortalnej (wg Schoen 2012).

włókien kolagenowych, jej grubość waha się od 21 – 48 μm . Włókna elastynowe tej warstwy zapewniają minimalną powierzchnię płatków podczas gdy zastawka jest otwarta oraz jej optymalne rozciągnięcie w fazie rozkurczu serca w odpowiedzi na ciśnienie wsteczne generowane przez krew. Środkowo położona blaszka gąbczasta, której grubość szacowana jest od 40 do 300 μm , składa się z luźno ułożonych włókien kolagenowych oraz obfitej ilości proteoglikanów i glikozaminoglikanów (GAG), głównie siarczanu chondroityny i kwasu hialuronowego. *Lamina spongiosa* cechuje się niewielką wytrzymałością mechaniczną, ale ma zdolność do akomodacji kształtu i dzięki obecności GAG o właściwościach silnie hydrofilowych zmniejsza tarcie pomiędzy warstwą komorową i włóknistą. Ma to istotne znaczenie w amortyzacji stresu naprężenia i odkształcenia generowanego podczas zamykania zastawki (Misfeld i Sievers 2007; Filová i wsp. 2009). Część włóknista płatką o grubości 80 – 170 μm zlokalizowana od strony tętnicy płucnej, łączy się z pierścieniem włóknistym zastawki. Blaszka włóknista charakteryzuje się dużą ilością równolegle ułożonych włókien kolagenowych, biegnących przeważająco w kierunku obwodowym (Ryc. 1-1). Zwarta struktura kolagenu i ich orientacja zapewniają wytrzymałość i optymalną sztywność płatków. Płatki zastawki płucnej są wystarczająco cienkie, co pozwala na wydajną perfuzję krwi z otoczenia, zapewniając jednocześnie właściwą wymianę gazową i odżywianie komórek, stąd w prawidłowo zbudowanej zastawce, znajdują się nieliczne



Ryc. 1-2 Schemat obrazujący ułożenie włókien kolagenowych i elastynowych w fazie skurczu i rozkurczu serca (wg Schoen 2012).

naczynia krwionośne za wyjątkiem tych w punkcie ich mocowania do ściany naczynia tętnicy (Rabkin-Aikawa i wsp. 2005). Anizotropia budowy wewnętrznej zastawki płucnej znajduje odzwierciedlenie we właściwościach mechanicznych. Włókna elastynowe ułożone w kierunku promieniowym zapewniają rozciągliwość płatków, natomiast obwodowo zorganizowane włókna kolagenowe efektywnie przenoszą naprężenia indukowane w trakcie ciśnienia rozkurczowego do pierścienia włóknistego i ściany tętnicy płucnej. Specjalizacja strukturalna w postaci fałdowania się włókien kolagenowych podczas ruchu płatków w fazie skurczu czy orientacja wiązek kolagenu w warstwie włóknistej w kierunku komisur minimalizują wiotczenie wierzchołków płatków, co zapewnia prawidłowe domykanie się zastawki (Ryc. 1–2) (Schoen i Levy 1999; Kaphingst i wsp. 2010; Parasuraman i wsp., 2016). Istotnym elementem, który nie wchodzi bezpośrednio w skład budowy samej zastawki, ale jest nieodłącznym komponentem wpływającym na jej prawidłową funkcję, jest pień płucny. Jak większość tętnic składa się z trzech podstawowych części: błony wewnętrznej (łac. *tunica intima*), błony środkowej (łac. *tunica media*) i błony zewnętrznej – przydanki (łac. *tunica adventita*) (Holzapfel i wsp. 2000) (Ryc. 1–3). Błona wewnętrzna utworzona jest przez komórki śródbłónka, które układają się w kierunku zgodnym z przepływem krwi. W warstwie pod śródbłónkowej zlokalizowana jest luźna tkanka łączna zawierająca włókna elastynowe i kolagenowe, pomiędzy którymi występują nieliczne fibroblasty oraz komórki mięśni gładkich. Błona środkowa jest najgrubsza z pośród trzech warstw. Składa się z włókien elastynowych w postaci blaszek ułożonych koncentrycznie w kierunku obwodowym. Pomiędzy nimi znajdują się wyłącznie



Ryc. 1-3 Schemat przedstawiający budowę naczynia tętnicy płucnej (na podstawie Holzapfel i wsp. 2000; <https://smart.servier.com>)

komórki mięśni gładkich, które poprzez właściwości kurczliwe regulują wielkość światła naczynia. Przydanka jest zazwyczaj o połowę cieńsza od błony środkowej, tworzą ją włókna kolagenowe i luźna sieć włókien elastynowych. Włókna kolagenowe zapobiegają rozciągnięciu tętnicy powyżej fizjologicznego limitu. Fibroblasty i makrofagi są głównymi komórkami tej warstwy. Znajdują się tu również naczynia krwionośne, które częściowo wnikają również do błony środkowej i zaopatrują tętnicę w substancje odżywcze oraz włókna nerwowe (Holzapfel i wsp. 2000).

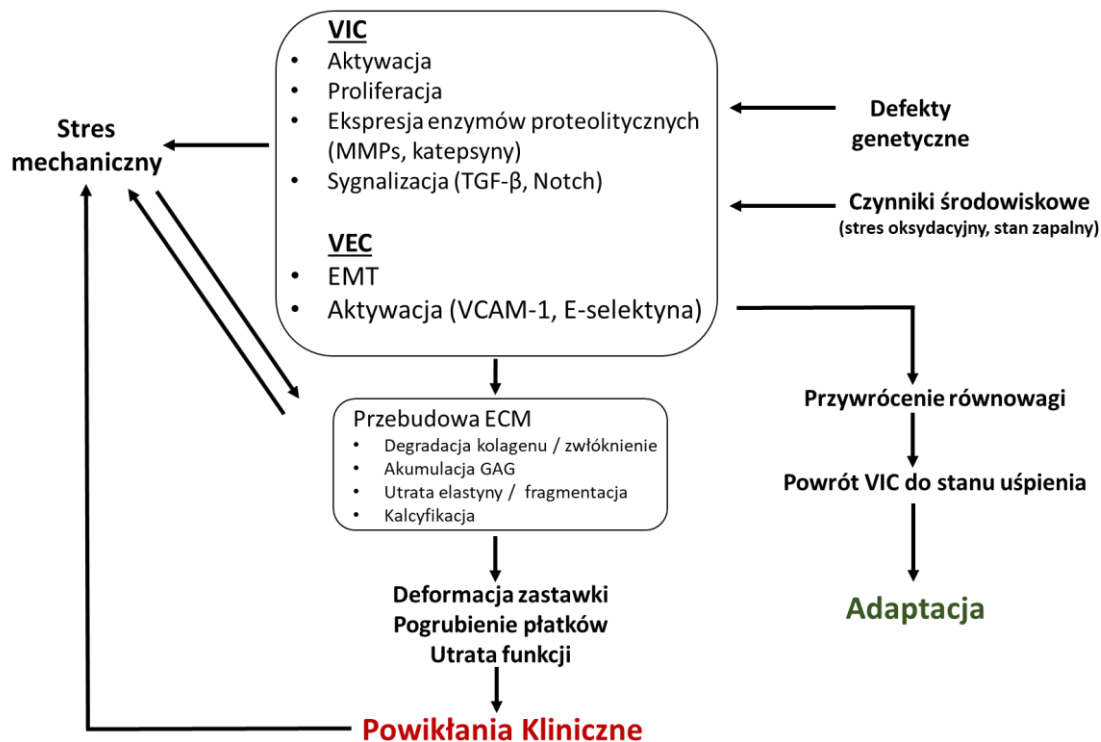
1.4 Komponenta komórkowa zastawki płucnej

Komórki będące składnikiem zastawek sercowych pełnią niezwykle istotną rolę, warunkującą prawidłowe funkcjonowanie całej konstrukcji. Komórki śródbłónka (ang. vascular endothelial cells – VEC) oraz komórki interstycjalne (ang. valve interstitial cells – VIC), rozpoznają zmiany otaczającego je środowiska i utrzymują homeostazę, adaptując się do warunków stresowych. Dzięki syntezie komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej pośredniczą w przebudowie tkanki łącznej i naprawie drobnych uszkodzeń (Schoen, 2016). Komórki śródbłónka, które wyściełają powierzchnię zastawki kontaktującą się z krwią, pełnią kluczową rolę jako naturalna warstwa atrombogenna. Właściwością, która je odróżnia od śródbłónka naczyniowego jest zdolność do zmiany fenotypu z komórek endotelialnych do komórek mezenchymalnych, dzięki czemu w okresie embrionalnym inicjowany jest proces tworzenia zastawek serca. Rola tego procesu w fizjologii dojrzałej zastawki jest nieznana, ale uważa się, że proces ten potencjalnie może stanowić mechanizm

naprawczy i umożliwiać remodelowanie zastawki w życiu dorosłym (Mahler i wsp. 2014). Komórki śródbłónka w odmienny sposób reagują również na działanie sił ścinających, mają orientację prostopadłą w stosunku do strumienia przepływającej krwi, podczas gdy komórki śródbłónka naczyniowego układają się w sposób równoległy (Butcher i wsp. 2004). Śródbłonek reaguje dynamicznie na sygnały z otaczającego środowiska, wydziela szeroką gamę czynników regulujących przepuszczalność i napięcie naczyń krwionośnych, a także czynniki wzrostu, cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej MHC (ang. major histocompatibility complex), wpływa także na proliferację komórek interstycjalnych. W warunkach fizjologicznych śródbłonek jest kluczowym czynnikiem w utrzymaniu płynnej konsystencji krwi, zapobiegającym procesom koagulacyjnym przez ekspresję siarczanu heparyny, produkcję trombomoduliny i inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (ang. tissue factor pathway inhibitor – TFPI) (Pober i Sessa 2007). W warunkach fizjologicznych komórki śródbłónka mają fenotyp komórek spoczynkowych. Pod wpływem działania takich czynników jak: patogeny, zmiany ciśnienia krwi, spadek stężenia tlenu czy przerwanie ciągłości tkanki następuje aktywacja komórek śródbłónka i zmiana ich fenotypu. Aktywowany śródbłonek wytwarza cytokiny, chemokiny, cząsteczki adhezyjne, wchodzące w interakcję z leukocytami oraz płytkami krwi, co w konsekwencji może skutkować dysfunkcją komórek śródbłónka (Deanfield i wsp. 2007). Nieprawidłowa czynność komórek śródbłónka prowadzi do rekrutacji leukocytów, sprzyja indukowaniu stanu zapalnego i w konsekwencji powstawaniu zmian patologicznych takich jak kalkyfikacja, usztywnienie płatków i postępującej z czasem degeneracji zastawki.

Kolejnym typem komórek i zarazem najliczniejszą grupą komórek budujących struktury zastawki są komórki śródmiaższu zwane również interstycjalnymi (VIC). Zaliczane są do nich komórki o morfologii i funkcji fibroblastów, komórek mięśni gładkich i miofibroblastów. Dzięki ekspresji metaloproteinaz (ang. matrix metalloproteinases - MMPs) enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową i ich inhibitorów (ang. tissue inhibitor metalloproteinase – TIMPs) biorą udział w przebudowie i ciągłych procesach naprawczych otaczających tkanek. Ich funkcja jest istotna, gdyż związana jest z syntezą kolagenu, elastyny i glikozaminoglikanów. W odpowiedzi na uraz lub zmienne środowisko, dochodzi do ich aktywacji, stan ten charakteryzuje się wzmożoną produkcją składników macierzy zewnątrzkomórkowej i czynników warunkujących przebudowę tkanki. Przyjmuje się istnienie pięciu fenotypów komórek interstycjalnych: embrionalne komórki progenitorowe śródbłónka/mezenchymalne (eVIC), uśpione (qVIC), aktywowane

(aVIC), dojrzałe progenitorowe (pVIC) i osteoblastyczne (obVIC) (Frederick J. Schoen 2016). Wraz z wiekiem ilość komórek śródmiaższu maleje i jest niższa u dorosłych aż o 90% w stosunku do ilości tych komórek w okresie płodowym. Oprócz zmian związanych z komponentą komórkową dochodzi z wiekiem do zmian w obrębie białek macierzy



Ryc. 1-4 Schemat obrazujący mechanizmy warunkujące defekty zastawek oraz ich adaptację do warunków środowiska (wg Schoen 2016, zmodyfikowany)

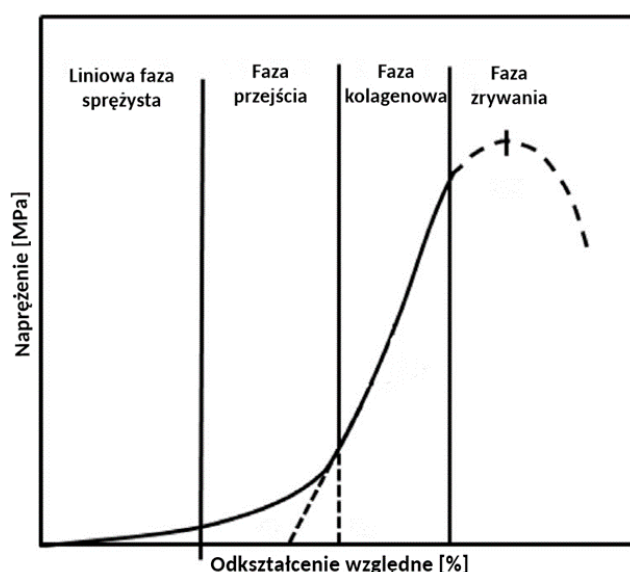
zewnętrzkomórkowej. Włókna kolagenowe z czasem tracą zdolność do fałdowania i przybierają morfologię zbliżoną do tej podczas rozkurczu serca (Ryc. 1 – 2). Struktura i skład macierzy zewnętrzkomórkowej zastawki jest głównym wyznacznikiem jej wytrzymałości mechanicznej, a ilość i jakość ECM zależy bezpośrednio od żywotności i funkcjonalności VIC (Chester i Taylor 2007; Schoen 2016). Współdziałanie VEC z VIC warunkuje procesy naprawcze, a zaburzenia w ich funkcji prowadzą do stanów patologicznych (Ryc. 1 – 4).

1.5 Praca zastawki serca w warunkach fizjologicznych

Zastawki serca są uważane za pasywne narządy poddane działaniu sił bezwładności przepływu krwi. Tkanki budujące zastawki wykonują pracę w złożonym, cyklicznym trybie rozciągania, ścinania i zginania, w trakcie której przez zastawki przedostaje się średnio od 3 – 5 L krwi na minutę. Generuje to wysoką prędkość przepływu, która przykładowo w zastawce aortalnej dochodzi do $1.3570.35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Szacuje się, że w warunkach *in vivo* odkształcenie w kierunku obwodowym dla płatków zastawki aortalnej wynosi 10% oraz 40%

w kierunku promieniowym, natomiast dla korzenia aorty 5% zarówno w kierunku promieniowym jak i obwodowym (Brewer i wsp. 1977; Thubrikar i wsp.1980). Większość naprężeń i odkształceń w płatkach zastawek półksiężycowatych występuje w cyklu rozkurczowym i podczas wczesnego otwierania się zastawki (Butcher i wsp. 2011). Thubrikar i wsp. (1980) obliczyli, iż całkowite naprężenie płatków w skurczu i rozkurczu ma odpowiednio 50 kPa i 500 kPa. W innych badaniach oszacowano maksymalne fizjologiczne obciążenia płatków, które wynosiło od 200 kPa do 400 kPa (Lee i wsp.1984; Christie 1992). Maksymalna wytrzymałość na rozciąganie płatków jest 10-krotnie wyższa, w porównaniu do maksymalnych naprężeń *in vivo* i mieści się w zakresie od 2 do 4 MPa (Leeson-Dietrich i wsp.1995). Powyższe wartości można traktować jako docelowe zakresy naprężeń i odkształceń podczas projektowania bioprotez (Lee i wsp.1984). Charakterystyka biomechaniczna ludzkich natywnych zastawek serca jest rzadko opisywana w literaturze ze względu na ograniczoną dostępność materiału tkankowego do badań (Clark 1973; Stradins i wsp. 2004). W niewielu badaniach oceniano właściwości zastawek serca u ludzi (Stradins i wsp. 2004; Balguid i wsp. 2007), podczas gdy wiele badań poświęcono właściwościom natywnych zastawek serca pochodzenia zwierzęcego, takich jak świńskie (Leeson-Dietrich i wsp.1995; Carew i wsp. 2003; Anssari-Benam i wsp. 2011) i owcze (Sodian i wsp. 2000; Hoerstrup i wsp. 2000) zastawki serca.

Jednoosiowe rozciąganie tkanki jest najpowszechniejszym sposobem pomiaru mechanicznych właściwości zastawek serca. Ryc. 1-5 przedstawia reprezentatywny przykład krzywej naprężenie – odkształcenie dla tkanek miękkich, na której widać, iż zachowanie tego rodzaju materiału jest nieliniowe. Krzywa podzielona jest na kilka



Ryc. 1-5 Typowa jednoosiowa krzywa naprężenia od odkształcenia dla tkanek miękkich, takich jak płatki zastawki aortalnej i płucnej serca (wg Hasan i wsp.2014; zmodyfikowany).

regionów, których charakterystyka może być związana z budową i specyficzną funkcją fizjologiczną tkanki. Głównymi fazami krzywej są: liniowa faza sprężysta o niskim naprężeniu wstępnym, która wiąże się z rozwijaniem pozwijanych włókien kolagenu i wydłużeniem włókien elastynowych; nieliniowa faza przejściowa (faza przejścia), która prawdopodobnie jest związana z przenoszeniem siły z włókien elastynowych na kolagenowe; liniowy region elastyczny (faza kolagenowa) związany z rozciąganiem włókien elastynowych i kolagenowych; nieliniowa faza zmniejszania stresu, podczas której dochodzi do pęknięcia i całkowitego zerwania tkanki (faza zrywania) (Hasan i wsp.2014).

1.6 Wady zastawek serca i ich przyczyny

Skoordynowane działanie komponentów aparatu zastawkowego jest niezwykle istotna dla jego prawidłowego funkcjonowania. Jednak w stanach patologicznych może dochodzić do utraty funkcjonalności zastawek serca. Dysfunkcja zastawki może być spowodowana wadą wrodzoną lub nabytą, w wyniku których może dochodzić do zwapnienia, zwłóknienia, fuzji, perforacji, pęknięcia lub rozciągnięcia płatków czy też poszerzenia światła zastawki (Maganti i wsp. 2010). Nieprawidłowe działanie zastawki ma miejsce gdy nie domyka się ona w pełni (niedomykalność) lub nie otwiera się całkowicie (zwężenie) obie te wady mogą współistnieć ze sobą. Głównymi przyczynami wad zastawek serca są:

Gorączka reumatyczna - stan zapalny, który powoduje odpowiedź autoimmunologiczną, zapoczątkowany ostrym zapaleniem błony śluzowej gardła.

Infekcyjne zapalenie wsierdza - stan zapalny, który prowadzi do zakażenia wewnętrznej wyściółki zastawek serca i komór serca.

Zwyrodnienie mięśniowe - dysfunkcja, w której tkanka zastawki traci elastyczność, staje się słaba i zwiotczała. Ten stan występuje u osób starszych.

Zaburzenia pracy zastawki mogą wiązać się z poważnymi konsekwencjami w postaci zastoinowej niewydolności serca, które polega na przepełnieniu naczyń żylnych krwią w płucach i innych narządach wewnętrznych powodując przekrwienie tkanek. Głównym objawem zastoinowej choroby serca jest bezdech oraz takie objawy jak zmęczenie, omdlenia, kołatanie serca i ból w klatce piersiowej. Rozwój choroby zastawkowej serca może trwać nawet do 20 – 30 lat, nie dając jednoznacznych objawów, do czasu diagnozy choroba często jest już w zaawansowanym stadium. W przypadku utraty funkcjonalności zastawki serca leczenie zachowawcze ma ograniczony zakres. Stosowane w tym przypadku leki można zaklasyfikować jako rozszerzające naczynia, diuretyki, antykoagulanty i leki przeciw arytmiczne, które na ogół zmniejszają jedynie intensywność objawów. Często

jednak ostateczną formą terapii jest implantacja protezy zastawkowej (Maganti i wsp. 2010; Schoen2016).

1.7 Komercyjnie dostępne protezy zastawek serca i ich ograniczenia

Wszczepienie sztucznej zastawki serca jako metody leczenia zastawkowej choroby serca sięga wczesnych lat sześćdziesiątych. W 1952 r. dr Charles Hufnagel wykonał pierwszą zakończoną sukcesem implantację kulkowej protezy swojego pomysłu do aorty zstępującej z pozostawieniem zastawki własnej pacjentki (Andersen 2009). W 1956 r. Murray dokonał pierwszej implantacji zastawki allogenicznej (Delmo Walter i wsp. 2012), a niedługo później, bo już 1965 r. dr Carpentier i jego zespół dokonali w Paryżu pierwszej pomyślnie zakończonej ksenotransplantacji zastawki aortalnej (Manji i wsp. 2015). W ciągu kolejnych 40 lat opracowano ponad 80 modeli protez dla pacjentów wymagających wymiany zastawki i przeprowadzono liczne badania kliniczne mające na celu doskonalenie dostępnych rozwiązań.

1.7.1 Protezy mechaniczne

Zastawki mechaniczne (mechanical heart valves – MHV) można podzielić na trzy podstawowe typy: kulkowe, jedнопłatkowe i dwupłatkowe. Zastawki kulkowe składają się z silikonowej kulki, pierścienia i trzech metalowych łuków tworzących klatkę. Charakteryzują się wysoką trwałością, lecz ich centralnie zamykana konstrukcja skutkuje wysoką wartością spadku ciśnienia wewnątrz zastawki i zbyt wysokim naprężeniem przy jej dystalnych końcach. Zastawki te nie są obecnie w użyciu jednak kilka tysięcy pacjentów nadal posiada tego typu protezy i wymagają monitorowania (Pibarot i Dumesnil 2009). Zastawki jedнопłatkowe składają się z pojedynczego uchylnego dysku zabezpieczonego metalową podpórką. W otwartej pozycji dysk omywany jest przez krew, kąt otwarcia tarczy względem pierścienia zaworu wynosi od 60° do 80°, co daje dwa wyloty o różnych rozmiarach. Konstrukcja zastawki dwupłatkowej przewiduje dwa półkoliste płatki typu zawiasowego, które otwierają się tworząc jeden środkowy i dwa otwory peryferyjne mające minimalizować zaburzenia przepływu krwi. Konstrukcje tego typu są najczęściej implantowanymi protezami mechanicznymi na świecie (Nair i wsp. 2003; Pibarot i Dumesnil 2009). Pomimo, iż MHV zapewniają rozwiązanie na długie lata (około 20 lat) i charakteryzują się wysoką odpornością na zużycie mechaniczne i strukturalne ich hemodynamika i profil przepływu krwi znacznie odbiega od fizjologicznego (Sun i wsp. 2009). Wywołuje to zaburzenia czynnościowe elementów morfotycznych krwi oraz tkanki śródbłonkowej otaczającej implant, co w konsekwencji powoduje wykrzepianie się krwi. Konieczna jest zatem dożywotnia terapia przeciwwzakrzepowa, zmniejszająca ryzyko tromboembolizacji (Schoen i Hoerstrup 2013). Aspiryna oraz agoniści witaminy K tj.

warfaryna samodzielnie lub w połączeniu stosowane są w długotrwałym leczeniu pacjentów z protezami zastawek serca. Leki z grupy agonistów witaminy K są trudne w stosowaniu w praktyce klinicznej, gdyż mają powolne działanie, wąskie okno terapeutyczne, a dawki muszą być dobierane indywidualnie do każdego pacjenta. Wchodzą również w interakcje z innymi lekami oraz niektórymi produktami spożywczymi (Singer i wsp. 2009). Pacjenci muszą być w związku z powyższym pod ciągłą obserwacją, co jest uciążliwe i wpływa negatywnie na komfort życia leczonego. Stosowanie terapii przeciwzakrzepowej wiąże się również z ryzykiem krwotoków wewnętrznych. Może to stanowić bezpośrednie przeciwwskazanie dla kobiet w wieku reprodukcyjnym chcących posiadać potomstwo (Quinn i wsp. 2009). Powikłania związane z krwotokiem występują u 6% - 23% kobiet w ciąży posiadających zastawki mechaniczne (Van Hagen i wsp. 2015), natomiast utrata płodu zgłoszona w różnych źródłach literaturowych dotyczy aż 24% - 65% tych kobiet (Chan i wsp. 2000; Ashour i wsp. 2000; Drenthen i wsp. 2010; Mazibuko i wsp. 2012; Basude i wsp. 2012). Wśród pacjentów narażonych na wysokie ryzyko powikłań są również osoby w podeszłym wieku, u których ryzyko krwotoków zwiększa się z wiekiem. Ilość incydentów wzrasta prawie o 3% u pacjentów powyżej 80 roku życia, w porównaniu do 60-latków, u których ryzyko krwotoków waha się w granicach 1,5% (Van Hagen i wsp. 2015). W przypadku pacjentów pediatrycznych przeciwwskazaniem do wszczepienia protezy mechanicznej jest jej rozmiar, u większych dzieci praktykuje się implanty o wymiarach zastawki dorosłej, w celu uniknięcia reoperacji związanej z rozwojem somatycznym, natomiast u mniejszych dzieci i noworodków wymagane są inne rozwiązania (Alsoufi 2014).

1.7.2 Protezy biologiczne

Protezy biologiczne można podzielić na autologiczne, do których zalicza się autografty i homografty oraz ksenogeniczne pozyskane z modyfikowanych tkanek odzwierzęcych. W przypadku dysfunkcji zastawki aortalnej możliwe jest wykonanie tak zwanej procedury Ross'a opisaney w 1967 r. Polega ona na wszczepieniu własnej zastawki płucnej pacjenta w pozycję aortalną, podczas gdy zastawka płucna zastąpiona jest homograftem. Zabieg ten ma szczególną wartość w przypadku operowanych dzieci, ponieważ translokowany pień płucny rośnie wraz z pacjentem. Operacja ta wymaga jednak wymiany obu zastawek płucnej i aortalnej, co znacznie zwiększa ryzyko operacyjne (Leopold i wsp. 2002).

1.7.2.1 Homografty

Homografty zwane również ludzkimi allograftami, są przeszczepami w obrębie tego samego gatunku. Zastawki pobierane są od osób zmarłych. Tkanka podlega obróbce w ściśle kontrolowanych warunkach najlepiej w ciągu 24 godzin od śmierci dawcy. Zastawki

przechowywane są po sterylizacji w 4 °C w specjalnym roztworze konserwującym lub poddawane krioprezervacji, co wydłuża zdecydowanie ich czas przechowywania. Konieczne jest jednak równomierne zamrażanie i rozmrażanie tkanki, które minimalizuje tworzenie się kryształków lodu przyczyniających się do nekrozy komórek i uszkodzenia tkanek. Zdecydowaną zaletą homograftów jest to, iż posiadają żywe komórki, w których skład wchodzi komórki endotelialne (VEC) oraz komórki śródmiaższu (VIC). Dzięki temu zdolność do przebudowy i atrombogeniczne właściwości zastawki są w znacznym stopniu zachowane. Ponadto obecne w takiej bioprotezie komórki endotelialne pośredniczą również w odpowiedzi immunologicznej co może czynić taką zastawkę odporną na infekcje. Oznacza to jednak większe prawdopodobieństwo odrzucenia homograftu zwłaszcza u dzieci i młodych pacjentów. Komórki te są również bardzo wrażliwe na wszelkie procesy przetwarzania zastawki, co może skutkować ich obumarciem i utratą funkcjonalności protezy w wyniku powolnej degeneracji tkanki. Słabym punktem jest także dostępność tkanek do przeszczepu, ich liczba jest ograniczona ilością dawców (Delmo Walter i wsp. 2012).

1.7.2.2 Ksenografty

W związku z ograniczoną dostępnością tkanek ludzkich, zastosowanie znalazły tkanki odzwierzęce czyli tak zwane ksenografty lub heterografty. Podlegają one modyfikacjom, których celem jest zapobieganie reakcji immunologicznej i odrzuceniu bioprotezy przez organizm pacjenta. W użyciu są najczęściej zastawki świńskie ze względu na swoje podobieństwo w działaniu i morfologii do zastawek ludzkich. Stosuje się również tkankę perikardium wołowego. Bioprotezy uszyte z perikardium bydlęcego składają się z maksymalnie trzech fragmentów, które przymocowane są do stentu. Bioprotezy świńskie natomiast stanowią nienaruszone konstrukcyjnie zastawki, które dzielą się na protezy zintegrowane ze stentem, co ułatwia ich implantację, lub bioprotezy bezstentowe (Vesely 2005). Głównym problemem w przypadku ksenograftów jest ich immunogenność wywołana obecnością mukopolisacharydów i strukturalnych glikoprotein. Najważniejszym oligosacharydem, stymulującym odrzut ksenograftu jest galaktoza- α -1,3-galaktoza (α – Gal), występująca w komórkach ssaków nienaczelných. Obecność epitopów Gal wywołuje w organizmie człowieka ostrą reakcję immunologiczną, co skutkuje odrzuceniem tkanki odzwierzęcej. W związku z powyższym oba typy tkanek wymagają modyfikacji, która minimalizuje antygenowość bioprotezy, efekt ten osiąga się przez utrwalanie tkanki (Manji i wsp. 2015).

1.8 Metody konserwacji bioprotez zastawek serca (BHV)

W przeważającej większości komercyjnie dostępnych zastawkowych bioprotezach do konserwacji chemicznej tkanki używany jest aldehyd glutarowy (GA). Sieciowanie tkanek w roztworze GA o stężeniu 0,2% – 0,6% maskuje częściowo antygeny i stabilizuje tkankę zabezpieczając przed proteolityczną degradacją. Tkanki traktowane GA zachowują integralność anatomiczną, elastyczność i wytrzymałość płatków zastawki. Ich przewagą nad protezami mechanicznymi jest ich dobra biokompatybilność, hemodynamika znacznie zbliżona do tej w żywej tkance i co kluczowe nie wymagają terapii przeciwzakrzepowej (Jayakrishnan i Jameela 1996).

1.9 Aldehyd glutarowy jako czynnik sieciujący białka

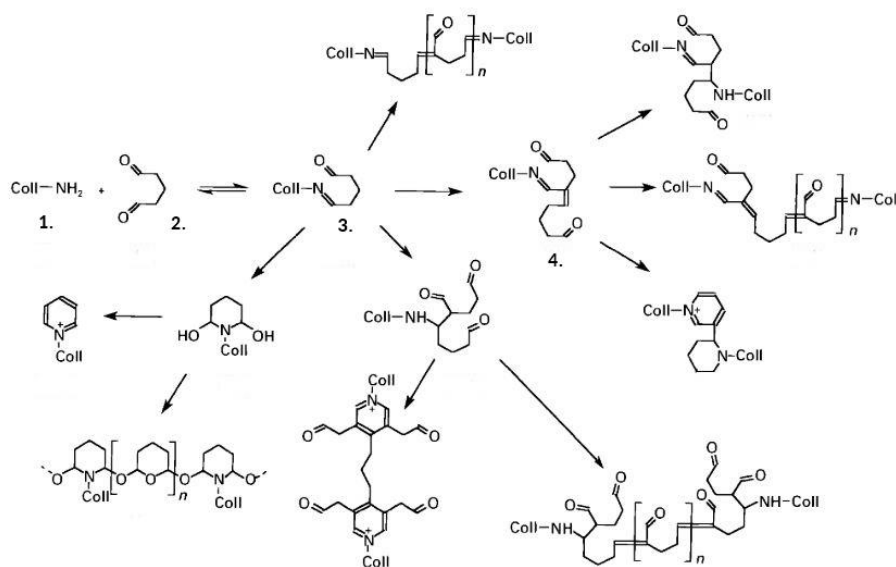
Wśród wielu dostępnych czynników sieciujących białka, aldehyd glutarowy znalazł niewątpliwie najszersze zastosowanie w różnych dziedzinach od przemysłu po branżę medyczną. Zawdzięcza to niskiej cenie, łatwej dostępności oraz wysokiej efektywności sieciowania. Związek ten znalazł zastosowanie w mikroskopii elektronowej oraz immunohistochemii. W zastosowaniach biomedycznych pełni rolę czynnika sieciującego w przygotowaniu bioprotez takich jak protezy zastawek serca, naczyń, elastycznych chrząstek, ścięgien, sztucznej skóry, czy łat perikardialnych (Russell i Hopwood 1976; Jayakrishnan i Jameela 1996; Sinha i wsp. 2012), a także co ciekawe do konserwacji wołowego perikardium wchodzącego w skład bionicznego serca Carmat (Petukhov i wsp. 2015). Znalazł również zastosowanie w farmacji przy konstruowaniu systemów kontrolowanego uwalniania leków. Jest również bardzo efektywnym środkiem sterylizującym (Jayakrishnan i Jameela 1996).

Aldehyd glutarowy to liniowy, pięciowęglowy dialdehyd, będący bezbarwną, przejrzystą, o oleistej konsystencji i ostrym zapachu substancją. Rozpuszcza się w każdej proporcji zarówno w wodzie, alkoholu jak i w rozpuszczalnikach organicznych. Dostępny zazwyczaj jako kwaśny roztwór (pH 3.0 – 4.0) o stężeniu od 2% do 70%. W środowisku o neutralnym pH, GA reaguje gwałtownie z grupami aminowymi, tworząc termicznie i chemicznie stabilne wiązania. Pomimo prostej struktury GA charakteryzuje się złożonym zachowaniem i reaktywnością w roztworach wodnych. Struktura i mechanizm działania GA była tematem wielu badań i dyskusji na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci. Okazuje się bowiem, że forma aldehydu glutarowego w wodnych roztworach nie ogranicza się do monomeru, może przybierać postać dimeru, trimeru lub polimeru o prostych, rozgałęzionych lub cyklicznych łańcuchach. Jego struktura zależna jest od środowiska roztworu i czynników takich jak stężenie, pH i temperatura (Jayakrishnan i Jameela 1996; Migneault i wsp. 2004). GA do sieciowania tkanek stosowany jest z powodzeniem od lat

60 tych. Wysokie powinowactwo w stosunku do białek w środowisku neutralnym opiera się na obecności kilku reaktywnych reszt występujących w białkach i form molekularnych GA w roztworze wodnym, co prowadzi do wielu możliwych mechanizmów reakcji oraz heterogenności produktów reakcji, których mnogość zobrazowano na Ryc. 1 – 6. Może on reagować z różnymi grupami funkcyjnymi białek takimi jak: aminowa, tiolowa, fenolowa czy aminokwasami zawierającymi pierścień imidazolowy (Migneault i wsp. 2004). Specyfika chemicznego wiązania kolagenu aldehydem glutarowym nie jest w pełni zrozumiała. Zakłada się, że sieciowanie zachodzi w sposób między- i wewnątrzcząsteczkowy przez tworzenie wiązań kowalencyjnych. Może to nastąpić na dwa sposoby: tworzenie zasad Schiffa (Ryc. 1 – 6 struktura 3.) w reakcji grupy aldehydowej (Ryc. 1 – 6 struktura 2.) z grupą aminową lizyny lub hydroksylizyny (Ryc. 1 – 6 struktura 1.) lub kondensację aldolową pomiędzy dwoma sąsiednimi aldehydami, której produkt oznaczono numerem 4 na Ryc. 1 – 6. Połączenie z zasadą Schiffa nie jest stabilnym wiązaniem, podczas gdy produkt kondensacji aldolowej jest trwały (Jayakrishnan i Jameela 1996) Zasada Schiffa przedstawiona na poniższym schemacie uważana jest za centralny środek pośredni, z którego może powstać kilka kolejnych reakcji, zanim powstanie ostateczny produkt sieciowania (Olde Damink i wsp. 1995). Sukces aldehydu glutarowego jako środka sieciującego jest wynikiem jego wieloskładnikowego charakteru, w którym kilka postaci występuje w równowadze w roztworze odczynnika przy danym pH. Jednak pomimo dużej wiedzy zebranej na ten temat dokładny skład molekularny roztworów GA, a także która forma jest najbardziej reaktywna, są dyskusyjne. W rezultacie mechanizm reakcji aldehydu glutarowego z białkowymi grupami aminowymi nie jest do końca zrozumiany, co ilustruje duża liczba mechanizmów zgłoszonych w literaturze (Jayakrishnan i Jameela 1996). GA uważany jest natomiast za najbardziej efektywny czynnik sieciujący wśród związków zaliczanych do aldehydów (Beauchamp i wsp. 1992). Stwierdzono również, że użycie niższego stężenia GA jest korzystniejsze niż stosowanie wysokich stężeń. Przy stosowaniu wyższych stężeń GA od 3 do 5 %, sieciowanie powierzchniowe gwałtownie wzrasta i utrudnia dalszą penetrację środka sieciującego, a zatem tkanka może być utrwalona nieprawidłowo (Cheung i Nimni 1985; Khor 1997).

1.10 Kalcyfikacja jako główne organicznie komercyjnie stosowanych bioprotez

Bioprotezy konserwowane chemicznie aldehydem glutarowym wszczepiane są pacjentom od lat 60 tych, wyniki badań na przestrzeni dziesięcioleci wykazały, iż nie są one jednak trwałym rozwiązaniem, gdyż z czasem ulegają procesowi powolnej degeneracji. Konserwacja chemiczna utrwala bioprotezę uśmiercając przy tym komórki interstycjalne oraz śródbłónka, (Bruck 1981; Schoen i Levy 2005) Prowadzi to z czasem do utraty funkcjonalności zastawki, w wyniku postępujących uszkodzeń mechanicznych tkanki co wymusza ponowną interwencję chirurgiczną u około 30% pacjentów w przeciągu 10 do 15 lat od implantacji bioprotezy (Iop i Gerosa 2015). Główną przyczyną zawodności wszystkich typów bioprotez jest ich wapnienie (Filová i wsp. 2009). Mechanizm kalcyfikacji bioprotezy jest złożony i nie do końca zbadany. Zależy jest od wieku i czynników fizjologicznych. Szybciej postępujące wapnienie obserwuje się u dzieci i kobiet w ciąży oraz osób z niewydolnością nerek, co można tłumaczyć wyższym stężeniem wapnia we krwi (Simionescu 2004). Alsoufi i wsp. 2009 wykazali na grupie 110 pacjentów w wieku od 15 – 18 lat, iż w ciągu 15 lat od wszczepienia bioprotezy, aż 66% pacjentów poddano reoperacji, a 16% pacjentów zmarło w wyniku utraty funkcjonalności protezy (Alsoufi i wsp. 2009). Powodem wzmożonej kalcyfikacji u młodych pacjentów może być również silniejsza reakcja immunologiczna na wszczepioną bioprotezę. Komórki układu immunologicznego, w tym limfocyty czy makrofagi, wydzielają szereg cytokin do środowiska takie jak osteopontyna, która bierze udział między innymi w przebudowie kości, ale również działa



Ryc. 1-6 Schemat możliwych reakcji aldehydu glutarowego (2.) z wolnymi grupami aminowymi białek (1.) (wg Olde Damink i wsp. 1995; - zmodyfikowany).

jako chemoatraktant rekrutujący komórki odpornościowe do miejsc zapalnych, co może być powiązane ze wczesnym wapnieniem protez zastawkowych. Reakcja immunologiczna może być wywołana niedostateczną redukcją immunogenności wszczepianej bioprotezy. Udowodniono, iż epitop α – Gal w komercyjnie dostępnych bioprotezach nie jest całkowicie zamaskowany. Naso i wsp. (2013) stosując techniki ELISA oszacowali ilość epitopów Gal obecnych na bioprotezach 7 różnych firm i wykazali, że tylko jedna proteza (Epic™) miała kompletnie zamaskowane epitopy Gal. Analiza ultrastruktury i histologiczna bioprotez pobranych od pacjentów wykazała obecność leukocytów fagocytyzujących włókna kolagenowe. Na części leukocytów obserwowano kryształki minerałów mogących stanowić ogniska kalcyfikacji. Źródła wapnienia upatruje się również w konserwacji protezy aldehydem glutarowym, który zaburza funkcję błon komórkowych oraz indukuje śmierć komórek. Powoduje to napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki i jego kumulację poprzez wiązanie się z fosfolipidami i białkami wiążącymi wapń. Jony fosforanowe produkowane przez fosfatazy reagują z wapniem i dają początek ogniskom hydroksyapatytu, który jest głównym składnikiem mineralizacji bioprotez (Kim 2001). Nie jest to jednak dowód na bezpośredni wpływ GA na proces kalcyfikacji, gdyż przyczyną wydają się tu martwe komórki i ich elementy degradacji. W zdrowej tkance VIC oraz rezydujące makrofagi uczestniczą w zachowaniu jej architektury poprzez ciągłą przebudowę i oczyszczanie z reszt komórkowych. W wyniku konserwacji, fizjologiczne mechanizmy są zaburzone i znacznie ograniczone, reszty komórkowe akumulują się i pośredniczą w kalcyfikacji przylegających włókien kolagenowych. Niezwiązany GA lub jego wolne grupy aldehydowe również uznawane są za bezpośrednią przyczynę wapnienia bioprotez (Vyavahare i wsp. 1998). Istnieje również teoria, że odkładanie wapnia może mieć związek ze stresem mechanicznym działającym na tkankę, biorąc pod uwagę fakt, iż ogniska wapnia wydają się być skoncentrowane w miejscach poddanych większemu stresowi (Simionescu 2004).

1.11 Alternatywy dla aldehydu glutarowego

Ponieważ stężenia GA stosowane w komercyjnie wszczepianych bioprotezach cechują się cytotoksycznością, która uniemożliwia repopulację komórkom w warunkach *in vivo*, bioproteza traci zdolność do przebudowy. W związku z powyższym prowadzone są badania nad substancjami, które mają właściwości sieciujące, ale charakteryzują się niską lub brakiem toksyczności umożliwiającym zasiedlenie bioprotezy przez komórki. Wśród badanych związków znajdują się czynniki sieciujące z grupy flawonoidów takie jak genipina (Huang i wsp. 1998; Yoo i wsp. 2011). Wiele badań potwierdziło niższą toksyczność genipiny niż GA. Genipina może reagować spontanicznie z aminokwasami lub białkami

tworząc ciemnoniebieskie pigmenty (Jeong i wsp. 2013). Jeong i wsp. (2013) w swoich badaniach zaobserwowali niższą stabilność termiczną i odporność na degradację enzymatyczną grupy traktowanej genipiną, w stosunku do tkanek stabilizowanych GA. Fizyczne metody sieciowania obejmują promieniowanie ultrafioletowe i fotoutlenianie z udziałem barwnika (PhotoFix®, Carbomedics, Austin, TX) (Turek 2010; Meuris i wsp. 2003). Alternatywne wiązania chemiczne obejmują również stabilizację za pomocą związków epoksydowych (Van Wachem i wsp. 2000; Meuris i wsp. 2003), azydków acylowych (Charulatha i Rajaram 2003), azydku difenylofosforu (Marinucci i wsp. 2003), cyjanamidu (Ma i Elisseff 2006), eteru diglicydyłowego (Marinucci i wsp. 2003), glikolu polietylenowego (PEG) (Dal Pozzo i wsp. 2000), diizocyjanianów (Park i wsp. 2013), karbodiimidu (Ultifix®, Medtronic, Minneapolis, MN), (Zilla i wsp. 2005; Park i wsp. 2013), triglicydyloaminy (Scott Rapoport i wsp. 2007), nadjodanu sodu (Mercuri i wsp. 2007) oraz reuteryny (Sung i wsp. 2002; Mendoza-Novelo i wsp. 2011a). Mimo, że znaczna część tych alternatywnych strategii sieciujących osiągała sukcesy w badaniach eksperymentalnych, tylko w niewielkim stopniu przełożyło się to na zastosowanie kliniczne. Metody te wykazały w badaniach niższą skłonność bioprotez do kalcyfikacji jednak w żadnym z wyżej wymienionych przypadków nie udowodniono tego w długoterminowych badaniach klinicznych, a mechanizmy stojące za wapnieniem tkanki przy użyciu tych alternatywnych środków utrwalających wymagają dalszych badań (Simionescu 2004). Aldehyd glutarowy w związku z powyższym nadal stosowany jest jako główny środek sieciujący w klinicznie stosowanych BHV (Lim i wsp. 2015).

1.12 Inżynieria tkankowa – w poszukiwaniu nowych rozwiązań

Skuteczna i optymalna bioproteza powinna charakteryzować się dużym podobieństwem do zastawki natywnej. Pożądany jest odpowiedni profil hemodynamiczny, ułatwiona dyfuzja tlenu i składników odżywczych, adaptacja tkanek do somatycznego wzrostu i pełna biokompatybilność pod względem braku reakcji immunologicznej stanu zapalnego oraz trombogenności. Idealna bioproteza powinna charakteryzować się również łatwą dostępnością i niskimi kosztami wytwarzania. Dzięki powyższym cechom wszczepiona pacjentowi bioproteza powinna stanowić permanentne rozwiązanie gwarantujące funkcjonalność przez całe życie (Iop i Gerosa 2015). Na ten moment proteza taka nie istnieje, biorąc pod uwagę ten fakt wciąż poszukuje się nowych rozwiązań pozwalających na optymalizację metod wytwarzania protez sercowych. Szczególne znaczenie w tym względzie ma rozwój dziedziny wiedzy jaką jest inżynieria tkankowa. Termin „Inżynieria tkankowa” narodził się około 1987 roku (Berthiaume i wsp. 2011). Powszechnie stosowaną definicję inżynierii tkankowej wprowadzili Langer i Vacanti, która mówi, że inżynieria

tkankowa jest to interdyscyplinarna dziedzina wiedzy, która wykorzystuje metody inżynierii i nauk przyrodniczych w celu tworzenia biologicznych substytutów, które przywracają, utrzymują lub poprawiają funkcję tkanki lub całego organu (Langer i Vacanti 1993). Strategie inżynierii tkankowej obejmują wykorzystanie biokompatybilnych materiałów naturalnych lub syntetycznych do tworzenia tak zwanych rusztowań tkankowych (ang. scaffold), które mogą być zasiedlane *in vitro* lub *in vivo* komórkami, przy jednoczesnym zastosowaniu czynników aktywnych biologicznie (Filová i wsp. 2009). Rusztowania wykorzystywane do projektowania nowych funkcjonalnych bioprotez zastawek serca (ang. tissue engineered heart valve – TEHV) mogą być wytwarzane na bazie polimerów syntetycznych lub naturalnych, które poddane odpowiedniej obróbce tworzą konstrukcje naśladujące macierz zewnątrzkomórkową tkanek. Inną strategią jest tworzenie matryc na bazie tkanek odzwierzęcych głównie świńskich i wołowych, które poddawane są procesowi decelularyzacji czyli usuwania komórek z ich struktur. Ideą tworzenia rusztowań jest eliminacja lub obniżenie immunogenności danej konstrukcji, a tym samym zapewnienie właściwej bazy, pozwalającej na ich zasiedlenie komórkami (Berthiaume i wsp. 2011; Xue i wsp. 2017).

1.13 Rusztowania syntetyczne

W ostatnich latach w inżynierii zastawek serca dużą popularnością cieszyły się rusztowania syntetyczne wykonane z bioresorbowalnych materiałów. Głównym założeniem tej strategii jest zasiedlanie tych rusztowań komórkami, które będą mogły się tam różnicować, proliferować i syntetyzować macierz zewnątrzkomórkową. Równolegle do procesu wytwarzania ECM powinna zachodzić powolna i kontrolowana degradacja polimerowego rusztowania, tak aby ostatecznie mógł on być zastąpiony przez autologiczną tkankę. Kluczowymi czynnikami w konstruowaniu matryc polimerowych jest ich biokompatybilność, niska toksyczność produktów degradacji oraz odpowiednia porowatość umożliwiająca adhezję i penetrację komórek do wnętrza rusztowania. Atutem materiałów polimerowych jest ich stały i kontrolowany skład, możliwość modelowania właściwości mechanicznych oraz czasu rozkładu, a także fakt, iż właściwości te są potencjalnie łatwe do wielokrotnego odtworzenia (Goyal i wsp. 2017). Polimerami biodegradowalnymi stosowanymi w tworzeniu matryc są między innymi: poli (kwas glikolowy) (PGA), poli (kwas mlekowy) (PLA), poli (kaprolakton) (PCL), alkohol poliwinylowy (PVA) ich kopolimery lub mieszanki tych polimerów (Alaribe i wsp. 2016). Polimery mają jednak często naturę hydrofobową, wykazują słabe właściwości zwilżania, co powoduje utrudnioną dystrybucję i adhezję komórek. Ponadto kwaśne produkty degradacji mogą wywoływać ogólnoustrojowe i lokalne reakcje organizmu w postaci

odczynu zapalnego. Chociaż rozwój technik, które pozwalają na uzyskanie geometrii o rosnącej złożoności uzyskane rusztowania nadal nie są w stanie aktywnie modulować zachowania komórki lub naśladować złożonego oddziaływania między komórkami danej tkanki a macierzą zewnątrzkomórkową (Gervaso i wsp. 2013).

1.14 Rusztowania biologiczne

Do przygotowania matryc biologicznych wykorzystuje się między innymi białka składowe ECM, takie jak kolagen (Parenteau-Bareil i wsp. 2010), elastyna (Simionescu i wsp. 2006), kwas hialuronowy (Embryol 2018), fibronektyna (Ciara C. i wsp. 2009) i fibryna (De la Puente i Ludeña 2014). Wśród biologicznych polimerów kluczową rolę w konstrukcji analogów zastawek serca pełni kolagen. Obecność kolagenu we wszystkich tkankach łącznych czyni go jedną z najlepiej zbadanych biomolekuł pozakomórkowej macierzy (ECM) i jako biomateriał ma wiele przydatnych właściwości. Jest biodegradowalny, biokompatybilny, hemostatyczny, charakteryzuje się niską immunogennością w obrębie gatunku oraz wysoką wytrzymałością na rozciąganie. Jest również łatwo modyfikowalny i działa synergistycznie z innymi bioaktywnymi składnikami (Flanagan i wsp. 2006; Parenteau-Bareil i wsp. 2010). Kolagen typu I jest odpowiednim materiałem do implantacji, ponieważ tylko u niewielkiego odsetka ludzi może powodować reakcję alergiczną (Charriere i wsp. 1989; Parenteau-Bareil i wsp. 2010). Doskonała adhezja komórkowa warunkowana jest przez bezpośrednie interakcje komórka – kolagen, które możliwe są dzięki receptorom komórkowym rozpoznającym specyficzną sekwencję w cząsteczkach kolagenu takie jak integryny błony komórkowej $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$ (Filová i wsp. 2009). Oczyszczony i odpowiednio przetworzony kolagen wyizolowany z tkanek formowany jest w postaci hydrożelu lub rusztowań o odpowiedniej porowatości, ze względu na dość szybką degradację, często wymaga sieciowania lub musi być stosowany w połączeniu z innymi polimerami (Parenteau-Bareil i wsp. 2010).

Do najpopularniejszych strategii otrzymywania rusztowań biologicznych zalicza się metody decelularyzacji. Ideą tych metod jest obniżenie immunogenności tkanki pozbywając się komponenty komórkowej z tkanki przy jednoczesnym zachowaniu właściwości i architektury macierzy zewnątrzkomórkowej. ECM składa się ze złożonej mieszaniny strukturalnych i funkcjonalnych białek pełniących istotne funkcje w morfogenezie tkanek i narządów. Przewagą wykorzystania ECM jako matrycy, nad innymi rozwiązaniami jest jej złożona trójwymiarowa ultrastruktura zbudowana z cząsteczek bioaktywnych, które wchodzi w bezpośrednią interakcję z komórkami (Alaribe i wsp. 2016). Wiadomo, iż ECM służy jako naturalny rezerwuuar czynników wzrostu i innych cząsteczek sygnałowych, działa zatem jako fizyczne wsparcie dla komórek, ale również jest zaangażowane w ciągłą

przebudowę tkanki, a tym samym przeżycie, migrację i proliferację wielu typów komórek (Vorotnikova i wsp. 2010). Otrzymanie rusztowania na bazie czystego ECM pozbawionego komórek dawcy o dobrze zachowanej i funkcjonalnej strukturze jest więc tematem wielu badań, czego świadectwem jest różnorodność prezentowanych w literaturze metod przetwarzania tkanek w celu osiągnięcia tego sukcesu.

1.15 Metody decelularyzacji

Wśród metod decelularyzacji wyróżniane są metody fizyczne, które obejmują zamrażanie, sonikację, wytrząsanie i oddziaływanie na tkankę wysokim ciśnieniem (Gilbert i wsp. 2006). Cykliczne rozmrażanie i zamrażanie tkanki powoduje lizę komórek poprzez rozerwanie błon komórkowych przez kryształki lodu. Wykazano, że cykle zamrażania i rozmrażania nie zmieniają znacząco właściwości mechanicznych ECM, jednak w celu usunięcia pozostałości błon i organelli komórkowych metoda ta musi być wspomagana innymi procesami (Crapo i wsp. 2011; Nonaka i wsp. 2014). Lizę komórek można wywołać także oddziałując odpowiednio dobranym ciśnieniem na tkankę. Metoda ta sprawdza się tylko w przypadku tkanek i narządów, które nie posiadają ściśle upakowanej struktury ECM (Gilbert i wsp. 2006). Jedną z najbardziej popularnych technik decelularyzacji jest zanurzenie tkanki w roztworach chemicznych, detergentowych i/lub enzymatycznych wraz z mechanicznym mieszaniem. Protokoły decelularyzacji były tematem licznych badań dla wielu różnych organów i ich tkanek, w tym dla przełyku (Keane i wsp. 2013), pęcherza moczowego (Yang B. i wsp. 2010), tchawicy (Zang i wsp. 2012), mięśni szkieletowych (Gillies i wsp. 2011), zastawek serca (Cebotari i wsp. 2010), nerwów obwodowych (Wang i wsp. 2014), rdzenia kręgowego (Zhu i wsp. 2018), chrząstki (Xu i wsp. 2017) i skóry właściwej (Moore i wsp. 2015). Czas inkubacji tkanki w celu pozbycia się komórek jest zależny od typu tkanki, jej grubości, gęstości i zawartości lipidów, a także czynników takich jak prędkość i efektywność wytrząsania oraz rodzaj zastosowanego enzymu/detergentu i jego stężenie (Crapo i wsp. 2011). Wśród odczynników stosowanych do decelularyzacji występuje duże zróżnicowanie, używane są: detergenty o charakterze, niejonowym, jonowym lub amfolytycznym, kwasy, zasady, alkohole, enzymy oraz czynniki chelatujące. Stosowane są także substancje organiczne takie jak fosforan tributylu zakłócający interakcje białko – białko, czy toksyny, których przykładem jest latrunkulina B, morska toksyna silnie zaburzająca działanie cytoszkieletu aktynowego (Keane i wsp. 2015). Dobór odpowiedniej metody decelularyzacji powinien być uzasadniony naukowo w celu osiągnięcia maksymalnej efektywności usuwania komórek, ale z zachowaniem natywnej struktury macierzy zewnątrzkomórkowej. Zazwyczaj w metodach decelularyzacji stosuje się kilka różnych substancji, które spełniają inne funkcje na danym etapie procesu.

1.15.1 Detergenty niejonowe

Ze względu na stosunkowo łagodny wpływ na strukturę tkanki, szeroko stosowanymi substancjami w metodach decelularyzacji są detergenty niejonowe. Zaburzają one interakcje typu lipid – lipid i lipid – białko, ale pozostawiają nienaruszone oddziaływania pomiędzy białkami, które po traktowaniu niejonowym detergentem powinny zachować swą funkcjonalną konformację (Seddon i wsp. 2004). Najszerzej stosowanym przedstawicielem z tej grupy jest Triton X-100. Decelularyzacja tkanek za pomocą Tritonu X-100 wykazała zróżnicowane wyniki. W przypadku zastosowania go do usuwania komórek z aortalnej zastawki serca zaobserwowano całkowite usunięcie komórek i jąder komórkowych z utrzymaniem struktury zastawki już po 24 h. Obecność komórek odnotowano natomiast w ścianie aorty (Grauss i wsp. 2005). W odniesieniu do elementów ECM zaobserwowano również, że Triton X-100 prowadzi do utraty GAG ze spadkiem zawartości lamininy i fibronektyny w tkance zastawki oraz perikardium (Grauss i wsp. 2005; Mendoza-Novelo i wsp. 2011).

1.15.2 Detergenty jonowe

Jonowe detergenty są skuteczne w rozpuszczaniu zarówno cytoplazmatycznych jak i jądrowych błon komórkowych, ale mają skłonność do denaturacji białek poprzez zakłócanie interakcji białko-białko (Seddon i wsp. 2004). Najczęściej stosowanymi detergentami jonowymi są dodecylsulfian sodu (SDS) i deoksycholan sodu (SDC) oraz Triton X-200 (Gilbert i wsp. 2006). SDS jest bardzo skuteczny w usuwaniu składników komórkowych z tkanki. W porównaniu z innymi detergentami SDS w sposób bardziej kompletny usuwa resztki jądrowe, kwasy nukleinowe i białka cytoplazmatyczne takie jak wimentyna. SDS ma tendencję do zaburzania natywnej struktury tkankowej, powoduje utratę integralności kolagenu, obniża zawartość GAG, choć wydaje się, że nie wpływa na zawartość kolagenu w tkance (Wang i wsp. 2014; Kawecki i wsp. 2018). Dezoksycholan sodu jest również skuteczny w usuwaniu pozostałości komórek, ale tylko w połączeniu z innymi środkami, stosowany samodzielnie nie wystarcza do usunięcia komórek z tkanki. Ma również tendencję do powodowania uszkodzeń w natywnej architekturze tkanki podobnie jak SDS (Roosens i wsp. 2016). Z drugiej strony, istnieją doniesienia naukowców, którzy wykazali, iż SDC skutecznie usuwa komórki z płuc, co było porównywalne do efektów osiąganych przy użyciu SDS, Tritonu X-100 i CHAPS. SDC może być zatem efektywnym środkiem do usuwania komórek dla tkanek i organów o mniej zwartej i wyraźnej strukturze ECM takich jak zastawka serca (Zvarova i wsp. 2016; Kawecki i wsp. 2018).

1.15.3 Detergenty amfolityczne

Detergenty amfolityczne wykazują właściwości zarówno detergentów jonowych, jak i niejonowych, choć mają większą tendencję do denaturacji białek niż te drugie. Przykładem substancji o tych cechach jest 3 - [(3-cholamidopropylo) dimetyloamonio] -1-propanesulfonian (CHAPS), który badano pod kątem decelularyzacji naczyń krwionośnych (Quint i wsp. 2011). Zerowy ładunek elektryczny netto na hydrofilowych grupach detergentów amfolitycznych chroni natywny stan białek podczas procesu decelularyzacji. CHAPS zachowuje strukturę kolagenu i zatrzymuje więcej GAG i elastyny niż detergenty jonowe tj. SDS, jednocześnie usuwając materiał jądrowy z tkanki (Petersen i wsp. 2012; O'Neill i wsp. 2013), kwestionuje się jednak jego wydajność usuwania komórek (Du i wsp. 2011).

1.15.4 Kwasy i zasady

Środki kwasowe i zasadowe skutecznie niszczą błony komórkowe i organelle wewnątrzkomórkowe poprzez solubilizację składników cytoplazmatycznych komórek, powodują także denaturację kwasów nukleinowych w tym RNA i DNA. Popularnie używane zasady i kwasy to: wodorotlenek amonu, siarczek sodu, wodorotlenek sodu i wodorotlenek wapnia oraz kwas octowy, kwas chlorowodorowy, kwas siarkowy i kwas nadoctowy. Stosowane są one do usunięcia komórek z gęsto upakowanych tkanek takich jak skóra właściwa czy pęcherz moczowy (Prasertsung i wsp. 2008; Sheridan i wsp. 2012). Wiele badań wskazuje jednak, że stosowanie tych środków degradowe w pewnym stopniu komponenty ECM w tym kolagen (Sheridan i wsp. 2012). Mendoza-Novelo i wsp. (2011) wykazali, iż na skutek oddziaływania na tkankę wodorotlenkiem wapnia następuje znaczna utrata GAG z tkanki osierdzia, co zmieniło jego właściwości lepkosprężyste. Zarówno kwasy jak i zasady mogą denaturować białka ECM, w tym kolagen i czynniki wzrostu redukując wytrzymałość konstrukcji, co było pokazane na przykładzie kwasu octowego i wodorotlenku sodu (Dong i wsp. 2009; Sheridan i wsp. 2012).

1.15.5 Alkohole

Alkohole lizują komórki przez ich dehydratację (Xu i wsp. 2007). Metanol lub etanol można stosować jako końcowe płukanie w celu usunięcia resztek kwasów nukleinowych z tkanki. Ponadto niepolarny łańcuch węglowy alkoholi rozpuszcza niepolarne substancje, takie jak lipidy (Montoya i McFetridge 2009). Etanol i izopropanol odwapniają tkankę i są stosowane do usuwania fosfolipidów w wątrobie, tkance tłuszczowej i rogówce (Prasertsung i wsp. 2008; Flynn 2010; Brown i wsp. 2011). Wykazano jednak, że wstępne traktowanie tkanki etanolem zmienia strukturę kolagenu przez sieciowanie ECM. Lumpkins i wsp. (2008) zastosowali mieszaninę 75% etanolu/25% acetonu do usunięcia komórek z tarczy stawu

skroniowo-żuchwowego świni. Po 24 godzinach tkanka nie miała widocznych jąder komórkowych, ale była trzykrotnie sztywniejsza niż tkanka natywna.

1.15.6 Enzymy

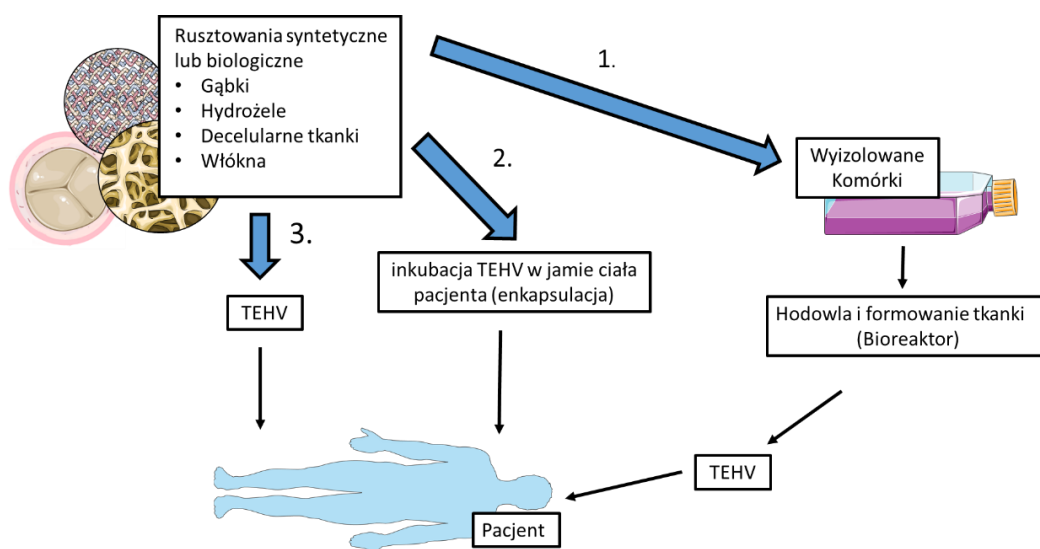
Środki enzymatyczne stosowane w metodach usuwania komórek obejmują proteazy (np. dyspazy, trypsanę), estereazy (fosfolipazę A2) oraz nukleazy (DNAzę i RNAzę). Ich skuteczność opiera się na specyficzności względem substratu. Dyspaza II jest proteazą bakteryjną, która rozdziela fibronektynę i kolagen IV w błonie podstawnej, jest stosowana do oddzielania warstw nabłonka od podłoża (Walter i wsp. 1998; Prasertsung i wsp. 2008). Stosowana jest w początkowych etapach decelularyzacji wielu tkanek, w tym skóry świni i rogówki, ale wymaga dodatkowego traktowania innymi środkami, aby uzyskać odpowiedni stopień decelularyzacji. Trypsyna jest jednym z najczęściej stosowanych enzymów proteolitycznych skutecznie oddziela komórki od tkanki selektywnie rozszczepiając białka przylegające do komórki po stronie karboksylowej aminokwasów argininy lub lizyny (Grauss i wsp. 2005; Yang M. i wsp. 2009). DNAza i RNAza są endonukleazami, które hydrolizują odpowiednio łańcuch deoksyrybonukleotydowy i rybonukleotydowy. Zazwyczaj dodaje się je do obróbki tkanki detergentem, aby pomóc w usunięciu śladowych ilości DNA i RNA (Rieder i wsp. 2005; Dong i wsp. 2009). Enzymatyczne metody decelularyzacji nie są wolne od niekorzystnego wpływu na pozakomórkowe składniki tkanek i narządów. Przykładowo przedłużone działanie trypsyny powoduje zaburzenie struktury ECM zastawki płucnej, ale nie wpływa na ilość kolagenu w tkance, powoduje jednak redukcję zawartości lamininy i fibroinektyny, a także elastyny i GAG. Takie zabiegi mogą przyczynić się do zmniejszenia wytrzymałości tkanki na rozciąganie nawet o 50% (Korossis i wsp. 2002; Grauss i wsp. 2005).

1.15.7 Czynniki chelatujące

Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) i kwas tetraoctowy glikolu etylenowego (EGTA) są powszechnie stosowanymi czynnikami chelatującymi, które wiążą kationy metali dwuwartościowych w miejscach adhezji komórek z ECM. Wywołuje to dysocjację komórek z ECM. EDTA i EGTA stosowane są w połączeniu z trypsyną (He i Callanan 2013) lub detergentami (Petersen i wsp. 2012), aby zapewnić całkowite usunięcie jąder komórkowych, zachowując jednocześnie skład i architekturę ECM. Ponieważ skuteczne zastosowania EDTA i EGTA są zazwyczaj stosowane w połączeniu z innymi środkami decelularyzującymi, bezpośredni efekt tych chemikaliów na ECM nie został określony.

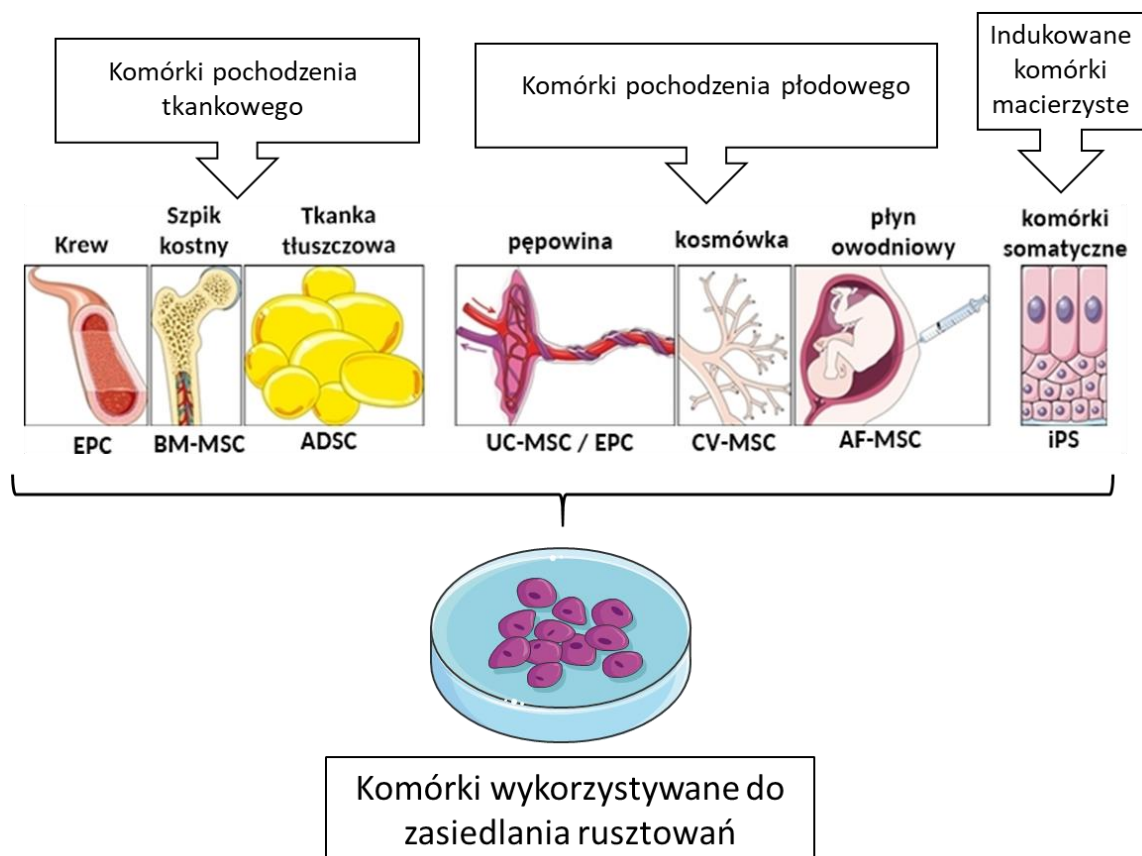
1.16 Zasiedlanie rusztowań biologicznych komórkami

W celu uzyskania pełnej funkcjonalności biologiczne rusztowanie zastawki serca musi mieć przywróconą komponentę komórkową, która jest kluczowa z punktu widzenia przebudowy ECM oraz aktywności biologicznej zastawki. Inżynieria tkankowa zastawek serca obejmuje trzy strategie przedstawione schematycznie na Ryc. 1 – 7. Pierwsza (Ryc. 1 – 7 strzałka 1)



Ryc. 1-7 Schematyczne przedstawienie trzech strategii inżynierii tkankowej (schemat własny na podstawie Ibrahim i wsp. 2017; <https://smart.servier.com>)

wymaga fazy *in vitro*, która obejmuje: izolację oraz hodowlę komórek autologicznych lub allogenicznych w warunkach laboratoryjnych, zasiedlenie rusztowań komórkami, hodowlę i formowanie tkanki w bioreaktorze (który symuluje metaboliczne i mechaniczne środowisko fizjologiczne) oraz implantację gotowego konstruktowi pacjentowi. Druga forma (Ryc. 1 – 7 strzałka 2) polega na wszczepieniu matrycy do jamy ciała pacjenta na przykład otrzewnej. Biorca staje się zatem tymczasowym „bioreaktorem”. Efektem tego działania jest reakcja na obce ciało i jego enkapsulacja czyli pokrycie matrycy tkanką włóknistą. Konstrukt zostaje następnie wszczepiony jako rusztowanie w miejsce chorej zastawki (Ibrahim i wsp. 2017). Trzecia strategia (Ryc. 1 – 7 strzałka 3.) omija rozległą fazę hodowli tkankowej *in vitro* przez proste wszczepienie bezkomórkowego rusztowania zastawek sercowych, które są wstępnie modyfikowane czynnikami zwiększającymi potencjał do spontanicznej adhezji komórek w organizmie (Weymann i wsp. 2013). Ma to głównie na celu przyciąganie do siebie komórek gospodarza, a następnie przebudowę tkanki *in situ*



Ryc. 1-8 Dostępne źródła komórek macierzystych wykorzystywanych w inżynierii tkankowej, Na schemacie przedstawiono potencjalne tkanki dawców oraz typy pozyskiwanych z nich komórek (schemat własny na podstawie Weber i wsp. 2012b); <https://smart.servier.com>

(Mendelson i Schoen 2006; Weber i wsp. 2012). W tworzeniu analogów tkankowych wykorzystywane są komórki o różnym pochodzeniu i typie, co zobrazowane zostało na Ryc. 1 – 8. Endotelialne komórki progenitorowe (EPC), po raz pierwszy zidentyfikowane przez Asahara i wsp. (2012), to jednojądrzaste komórki wykazujące ekspresję markerów linii komórek hematopoetycznych zdolne do różnicowania się w komórki śródbłónka, które wyściełają naczynia krwionośne i zastawki sercowe (Głowińska-Olszewska i wsp. 2011). EPC uczestniczą w postnatalnym procesie waskulogenezy, utrzymują naczyniową homeostazę, promują reendotelializację po uszkodzeniu śródbłónka i neowaskularyzację w przypadku niedokrwienia tkanki (Mendelson i Schoen 2006). EPC zostały zbadane jako możliwe alternatywne źródło komórek śródbłónka, które mogą być w łatwy sposób wyizolowane z krwi obwodowej, szpiku kostnego i krwi pępowinowej (Weber i wsp. 2012b).

Cebotari i wsp. (2006) wszczepili dwóm pediatrycznym pacjentom w wieku 11 i 13 lat ludzkie decelularne allografty zastawki płucnej, inkubowane uprzednio przez 21 dni w bioreaktorze w obecności autologicznych komórek EPC. Podczas 3,5 rocznego okresu

obserwacji bioprotezy wykazywały prawidłową pracę i hemodynamikę. Co ciekawe, w przypadku obu pacjentów, wielkość pierścienia zastawki wzrosła wraz ze wzrostem somatycznym pacjenta i w przypadku jednego z nich niedomykalność zastawki zmniejszyła się, co zinterpretowane zostało jako fizjologiczny wzrost TEHV. Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells – MSC) są atrakcyjne pod względem dostępności, mają potencjał do różnicowania się na wiele linii komórkowych *in vivo* przy pewnej biochemicznej i mechanicznej stymulacji, wykazują unikalne cechy immunologiczne pozwalające na utrzymywanie się w warunkach allogenicznych, ale także pośredniczą w przyciąganiu komórek progenitorowych i układu odpornościowego gospodarza mających zdolności naprawcze. Wykazują wysoką zdolność proliferacyjną *in vitro* demonstrującą ich charakter komórek macierzystych (Schmidt i Hoerstrup, 2005; Weber i wsp. 2012b). Źródłem MSC może być szpik kostny (ang. Bone marrow mesenchymal stem cells; BM-MSC), tkanka tłuszczowa (ADSC) (Bunnell i wsp. 2008), pępowina, (UC-MSC), kosmówka lub płyn owodniowy (AF-MSC lub CV-MSC) (Weber i wsp. 2002). Komórki te w zależności od ich źródła mają inne zdolności do różnicowania się (Kern i wsp. 2006). Hoerstrup i wsp. (2002) z powodzeniem zastosowali MSC pochodzące z ludzkiego szpiku kostnego (BM-MSC) do wytwarzania żywych, trzypłatkowych zastawek serca w warunkach *in vitro* podczas gdy Sutherland i wsp. (2005) wykazali także początkową satysfakcjonującą skuteczność *in vivo* analogów tkankowych zastawki płucnej pokrywanych BM-MSC na modelu owczym. Po 8 miesiącach od wszczepienia rusztowania wykazywały korzystne zmiany w zawartości ECM, w porównaniu z stadium początkowym. Zaobserwowano dystrybucję komórek o różnym fenotypie od komórek endotelialnych, miofibroblastów do fibroblastów w obrębie struktury płatków, co przypominało budowę tkankę natywną. Kilka badań wykazało, iż komórki ADSC oprócz fenotypu komórek mezenchymalnych charakteryzowały się cechami endotelialnych komórek progenitorowych (EPC), przejawiając ekspresję specyficznych markerów swoistych dla śródbłonna, gdy były hodowane *in vitro* w obecności VEGF oraz utrzymywały potencjał różnicowania się w komórki śródbłonna w warunkach *in vivo* (Colazzo i wsp. 2010). Colazzo i wsp. (2011) badali wykorzystanie ADSC w interakcjach tkanek zastawek serca *in vitro* z obiecującymi początkowymi wynikami dotyczącymi tworzenia kolagenu i elastyny. Schmidt i wsp. (2006a; 2006b; 2008) w kilku swoich badaniach wykazali, iż komórki pobierane z pępowiny (UC-MSC), płynu owodniowego (AF-MSC) i kosmówki (CV-MSC) stanowiły istotne źródło komórek, w tworzeniu „żywych” analogów zastawek serca. Wykazano także, iż komórki pozyskane z płynu owodniowego i pępowiny nie tracą swoich cech po krioprezerwacji, co rozszerza wszechstronność tego źródła komórek (Sodian i wsp. 2006; Schmidt i wsp. 2008). Obiecujące zastosowanie w TEHV wydają się mieć indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS), które wraz

embrionalnymi komórkami macierzystymi (ES) stanowią potencjalnie nieskończone źródło komórek w regeneracji tkanek. Komórki ES pochodzą z zarodkowego stadium blastocysty, ich zastosowanie wiąże się jednak z kontrowersyjnym pobieraniem tych komórek, w wyniku którego dochodzi do uśmiercenia zarodka. Komórki iPS natomiast powstają ze zróżnicowanych komórek somatycznych wystawionych na działanie odpowiedniego zestawu czynników transkrypcyjnych indukujących pluripotencję (Takahashi i Yamanaka 2006). Komórki iPS są atrakcyjnym źródłem komórek, ponieważ mogą być generowane z własnych komórek pacjenta, obniżając znacznie odrzucenie przeszczepionych komórek i unikając kwestii etycznych (Araki i wsp. 2013; Hirschi i wsp. 2014). Ponieważ zastosowaniu komórek ES i iPS może towarzyszyć formowanie guzów, ścisły poziom kontroli nad losem każdej komórki ma kluczowe znaczenie dla ich bezpiecznego stosowania (Nazareth i wsp. 2013).

2 CELE BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE

2.1 Uzasadnienie tematu badań oraz cele badawcze

Inspiracją do podjęcia tematyki badawczej prezentowanej w niniejszej rozprawie doktorskiej było poszukiwanie bioprotez zastawek serca o satysfakcjonujących właściwościach hemodynamicznych i biomechanicznych możliwych do zastosowań kardiochirurgicznych. Najbardziej wymagającą grupą są pacjenci pediatryczni, których rozwój somatyczny, wzmożona odpowiedź immunologiczna i podatność na szybkie wapnienie bioprotez sprawiają, iż konwencjonalne metody są dla tych pacjentów niewystarczające. Biologiczne rusztowania otrzymywane na drodze decelularyzacji stanowią obiecującą alternatywę dla istniejących na rynku rozwiązań. Żadna metoda decelularyzacji nie gwarantuje jednak całkowitego usunięcia komórek z tkanki, przy zachowaniu nienaruszonych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Powszechnie jest zatem stosowanie różnych wariantów substancji przedstawionych w paragrafie 1.15 do usuwania komórek z tkanek wraz z odpowiednio dobranym czasem, temperaturą i czynnikami fizycznymi takimi jak wytrząsanie, dla zoptymalizowania danej metody. W procesie tworzenia biologicznych rusztowań uzasadnione wydaje się również użycie czynników sieciujących dla wzmocnienia konstrukcji matrycy i ochrony przed enzymami proteolitycznymi w warunkach *in vivo*. Badania wykazały również, iż sam proces decelularyzacji nie eliminuje reakcji immunologicznej organizmu biorcy na wszczepianą bioprotezę, co może być zmniejszone przez użycie czynnika sieciującego jakim jest GA (Kasimir i wsp. 2006; Zhou i wsp. 2010). Podstawą dla skonstruowania funkcjonalnej bioprotezy jest również odtworzenie komponenty komórkowej zastawki. Ponieważ GA jest substancją toksyczną istotna jest więc modyfikacja przygotowanych rusztowań tak, aby umożliwić komórkom ich zasiedlenie i utworzenie warstwy funkcjonalnego śródbłonka. Na podstawie powyższych założeń zdefiniowano następujące cele pracy:

1. Porównanie oddziaływania wybranych metod decelularyzacji – „enzymatycznej” (D1) oraz „detergentowej” (D2), na właściwości mechaniczne tkanek kolagenowych oraz właściwości strukturalne macierzy zewnątrzkomórkowej rusztowań pozyskiwanych z zastawki płucnej.
2. Ocena mechanicznych właściwości decelularnych rusztowań biologicznych poddanych działaniu wybranych stężeń aldehydu glutarowego (GA; 0,5%; 0,025%; 0,0125%).
3. Sprawdzenie stopnia kalcyfikacji tkanek poddanych modyfikacji z użyciem wybranych stężeń GA oraz w zależności od zastosowanej metody decelularyzacji.

4. Ocena cytotoksyczności wybranych stężeń GA na komórki śródbłónka naczyniowego oraz zdolność zasiedlania komórkowego rusztowań, w tym:
- a) Ocena odpowiedzi cytotoksycznej komórek śródbłónka w bezpośrednim kontakcie z modyfikowanymi GA rusztowaniami.
 - b) Zbadanie aktywacji komórek śródbłónka w kontakcie z ekstraktami pozyskanymi z modyfikowanych rusztowań.

2.2 Hipotezy badawcze

Uwzględniając powyższe cele główne sformułowano następujące hipotezy badawcze:

H 1.0: Zastosowane metody decelularyzacji tkanek (D1 – enzymatyczna i D2 – detergentowa), przy zachowaniu takiej samej efektywności pod względem usuwania komórek z tkanki nie wykazują istotnych różnic w oddziaływaniu na struktury macierzy zewnątrzkomórkowej.

H 1.1: Metoda D1 w większym stopniu upośledza biomechanikę i właściwości morfologiczne tkanek, w porównaniu z metodą D2.

H 2.0: Zastosowane stężenia GA (0,05%; 0,025%, 0,0125%) będą powodowały trwałą stabilizację biomechaniczną tkanek. Odzwierciedleniem tego będzie wzrost wartości modułu elastyczności, w porównaniu do tkanek decelularnych niesieciowanych.

H 2.1: Niższe z zastosowanych stężeń GA nie będą powodowały trwałej stabilizacji biomechanicznej tkanek. Nie będzie obserwowany wzrost wartości modułu elastyczności, w porównaniu do tkanek decelularnych niesieciowanych.

H 3.0: Stopień kalcyfikacji tkanek modyfikowanych za pomocą GA w zastosowanych stężeniach będzie większy, w porównaniu do tkanek natywnych. Zakłada się jednak, że nie wystąpią różnice w stopniu kalcyfikacji pomiędzy zastosowanymi stężeniami GA.

H 3.1: Zastosowanie skrajnie niskiego stężenia GA (0,0125%) będzie skutkowało istotną redukcją kalcyfikacji, w porównaniu do wyższych stężeń GA.

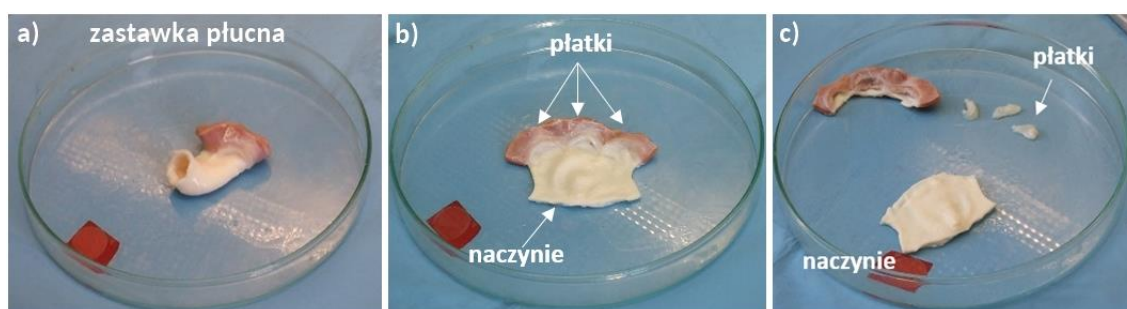
H 4.0: Stosowane stężenia GA nie będą wykazywały istotnego działania cytotoksycznego zwłaszcza na komórki śródbłónka i nie będą ograniczyły możliwości zasiedlania komórkowego decelularnych rusztowań biologicznych. Zasiedlanie komórkowe tkanek modyfikowanych za pomocą niskich stężeń GA będzie umożliwiało stymulowanie naturalnych procesów remodelowania i w konsekwencji przyczyni się do ograniczenia procesów degeneracyjnych oraz kalcyfikacji tkanek.

H 4.1: Pomimo zastosowania niskich stężeń GA wystąpią efekty cytotoksyczne na komórki śródbłónka, ograniczające możliwości zasiedlania komórkowego decelularnych rusztowań biologicznych.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Pobranie i przygotowanie materiału do badań

Materiał do badań stanowiły fragmenty tkanek pobrane z zastawki pnia płucnego serca świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*). Próbkę ze względu na niejednorodną budowę histologiczną, podzielono na dwa rodzaje: płatki zastawki płucnej oraz fragmenty naczyń zastawki płucnej (Ryc. 3 - 1). Serca pobierano w sposób sterylny w lokalnej rzeźni (materiał odpadowy pozyskany w zakładzie mięsnym „HAM” w Radzionkowie) w czasie nie dłuższym niż 1 godzina od uboju zwierząt. Narządy transportowano do laboratorium w stanie schłodzonym w 4 °C w jałowym roztworze Ringera. Preparacji zastawek pnia płucnego dokonywano tego samego dnia w czasie nie dłuższym niż 3 godziny od pobrania serc. Zastawka płucna była wypreparowana oraz dokładnie oczyszczana za pomocą narzędzi chirurgicznych zgodnie z techniką obowiązującą w banku tkanek ludzkich. Zastawki wykorzystywano do badań w terminie nieprzekraczającym 4 tygodni od ich preparacji. Do badań pobrano łącznie ponad 400 serc. Wykorzystane w badaniach tkanki podzielono na grupy badawcze zaprezentowane w Tab. 3 - 1.



Ryc. 3-1 Zdjęcia przedstawiają kolejno: a) wypreparowaną zastawkę pnia płucnego, b) rozciętą zastawkę pnia płucnego z zaznaczonymi płatkami oraz naczyniem, c) wypreparowane płatki oraz fragment naczynia pnia płucnego.

Tab. 3-1 Wyróżnione grupy badawcze. W tabeli znakiem „x” oznaczono włączenie grupy do danego eksperymentu.

OPIS GRUPY BADAWCZEJ	SKRÓT		Nazwa eksperymentu					
			Ocena wybranych właściwości morfologicznych matrycy	Badanie cytotoksyczności pośredniej GA z ekstraktów na komórki śródbłonna	Zasiedlanie matrycy komórkami śródbłonna	Ocena wybranych właściwości mechanicznych matrycy	Ocena stopnia kalcyfikacji matrycy w teście <i>in vitro</i>	Badanie oporności matrycy na degradację enzymatyczną
Tkanki natywne - N	Np	Nn	X	-	-	X	X	X
N - traktowane 0,0125% roztworem aldehydu glutarowego - GA1	NpGA1	NnGA1	-	-	-	-	X	-
N - traktowane 0,025% roztworem aldehydu glutarowego - GA2	NpGA2	NnGA2	-	-	-	-	X	-
N - traktowane 0,05% roztworem aldehydu glutarowego - GA3	NpGA3	NnGA3	-	-	-	-	X	-
Matryce decelularne - metoda D1	D1p	D1n	X	X	X	X	X	X
D1 traktowane 0,0125% roztworem aldehydu glutarowego - GA1	D1pGA1	D1nGA1	X	X	X	X	X	X
D1 traktowane 0,025% roztworem aldehydu glutarowego - GA2	D1pGA2	D1nGA2	X	X	X	X	X	X
D1 traktowane 0,05% roztworem aldehydu glutarowego - GA3	D1pGA3	D1nGA3	X	X	X	X	X	X
Matryce decellularne - metoda D2	D2p	D2n	X	X	X	X	X	X
D2 traktowane 0,0125% roztworem aldehydu glutarowego - GA1	D2pGA1	D2nGA1	X	X	X	X	X	X
D2 traktowane 0,025% roztworem aldehydu glutarowego - GA2	D2pGA2	D2nGA2	X	X	X	X	X	X
D2 traktowane 0,05% roztworem aldehydu glutarowego - GA3	D2pGA3	D2nGA3	X	X	X	X	X	X

3.2 Sterylizacja materiału biologicznego

Zastawki po wypreparowaniu poddawano sterylizacji w kąpeli antybiotykowej na bazie płynu Ringera (skład roztworu sterylizującego zaprezentowano w tabeli 3 - 3, punkt 1). Tkanki sterylizowano w roztworze przez 5 dni w temperaturze 4 °C w objętości 250 mL przypadającej na 1 zastawkę. Po sterylizacji materiału wszystkie czynności związane z jego

modyfikacją wykonywano w warunkach aseptycznych w komorze laminarnej wykorzystując jałowe narzędzia.

3.3 Przygotowanie decelularnych matryc płatków i naczyń zastawki pnia płucnego

W celu otrzymania decelularnych matryc (rusztowań, skafoldów) zastosowano dwie metody usuwania komórek z tkanki, które oznaczono jako: D1 oraz D2. W metodzie D1 (enzymatyczno-detergentowa; w dalszej części dla uproszczenia nazywaną metodą enzymatyczną) do decelularyzacji jednej zastawki wykorzystano 250 mL sterylnego 1% roztworu trypsyny z 0,05% EDTA, w którym umieszczano tkanki na 48 h w temperaturze 37 °C (roztwór enzymu wymieniano na świeży po pierwszej dobie). Po tym czasie, w celu usunięcia reszt komórkowych, tkanki umieszczano w temperaturze pokojowej na 30 minut w 250 mL 0,5% roztworu SDS (skład przedstawiono w Tab. 3 – 3, punkt 3), następnie matryce płukano przez 3 godziny w 250 mL jałowego roztworu Ringera, który wymieniano co godzinę na świeży. W metodzie D2 (detergentowej) do usunięcia komórek z tkanki wykorzystano roztwór deoksycholanu sodu z Tritonem X-100 i antybiotykami (skład przedstawiono w Tab. 3 – 3, punkt 4), tkanki inkubowano w 250 mL roztworu w temperaturze 37 °C przez 24 h. Następnie matryce płukano w temperaturze pokojowej przez 24 h w roztworze kąpieli antybiotykowej na bazie PBS (Tab. 3 – 3, punkt 2), proces powtarzano 3 krotnie, każdorazowo wymieniając roztwór kąpieli antybiotykowej na świeży. W kolejnym etapie matryce przez 24 h poddawano działaniu mieszaniny enzymów DNAzy i RNAzy (skład zaprezentowano w Tab. 3 – 3, punkt 5) w temperaturze 37 °C. Po etapie trawienia enzymatycznego proces płukania powtarzano przez kolejne 24 h. Oba procesy decelularyzacji na każdym etapie prowadzono w warunkach ciągłego wytrząsania przy wartości 150 rpm · min⁻¹. Po zakończonym cyklu matryce przechowywano w kąpieli antybiotykowej na bazie PBS.

3.4 Konserwacja chemiczna decelularnych matryc płatków i naczyń zastawki płucnej roztworami aldehydu glutarowego (GA)

Decelularne matryce płatków i naczyń traktowano roztworami aldehydu glutarowego o następujących stężeniach: 0,0125%, 0,025%, 0,05%, które oznaczono kolejno GA1, GA2, GA3. Roztwory GA sporządzono na bazie PBS pozbawionego jonów wapnia i magnezu o pH 7,4 (Tab. 3 – 3, punkt 6, 7, 8). Pojedynczą matrycę zastawki pnia płucnego inkubowano w 125 mL odpowiedniego roztworu GA w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po zakończonym sieciowaniu rusztowania płukano w roztworze PBS przez 24 h, a następnie

przechowywano w kąpeli antybiotykowej. Oba etapy odbywały się w warunkach ciągłego wytrząsania ($150 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$).

3.5 Przygotowanie materiału natywnego

Tkanki natywne (N) po wypreparowaniu przechowywane były w kąpeli sterylizującej i nie podlegały procesowi usuwania komórek. Stanowiły materiał porównawczy dla decellularnych matryc oraz decellularnych matryc traktowanych GA.

3.6 Kwalifikacja histologiczna materiału badawczego.

Tkanki kwalifikowano do badań na podstawie analizy histologicznej preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną. (szczegółowy opis przygotowania preparatów histologicznych znajduje się w rozdziale 3.7). Tkanki oceniono za pomocą mikroskopii świetlnej (Carl Zeiss, Observer. Z1, Niemcy). Próbkę badano pod kątem obecności nacieków zapalnych i ograniczonej komórkowości. Tkanki wykazujące powyższe nieprawidłowości dyskwalifikowano na tym etapie do dalszych badań.

3.7 Ocena wybranych właściwości morfologicznych decelularnych matryc

3.7.1 Przygotowanie preparatów histologicznych do barwienia

W celu przygotowania preparatów do analizy histologicznej z tkanek natywnych płatków i naczyń zastawki płucnej oraz decelularnych matryc pobierano fragmenty, które przechowywano w 4% roztworze formaldehydu o pH 6,9, minimum 24 h. Fragmenty tkanek następnie umieszczano w roztworach alkoholu etylowego o stężeniach: 70%, 95% oraz alkoholu absolutnym, w każdym roztworze tkanki przetrzymywano przez 1 godzinę, natomiast etap inkubacji w alkoholu absolutnym powtarzano do całkowitego odwodnienia tkanki. Odwodnione próbki zalewano ksylem (mieszanina izomerów) na okres 2-5 minut. Po tym czasie tkanki umieszczano w ciekłej parafinie i inkubowano przez 48 h (parafinę wymieniono na świeżą po 24 h) w temperaturze topnienia parafiny. Próbki zatopione w bloczkach parafinowych cięto na mikrotomie (Leica RM2125RT, Niemcy) otrzymując skrawki o grubości $4 \mu\text{m}$, które rozkładano na szkiełku podstawowym. W celu usunięcia parafiny z preparatu umieszczano go na noc w temperaturze 60°C . Następnie preparat uwadniano zanurzając go na 5 minut w każdym z kolejnych roztworów: ksylen 1, ksylen 2, alkohol etylowy absolutny 1, alkohol etylowy absolutny 2, alkohol etylowy 80%, woda destylowana. Tak przygotowane preparaty były gotowe do wykonania barwienia.

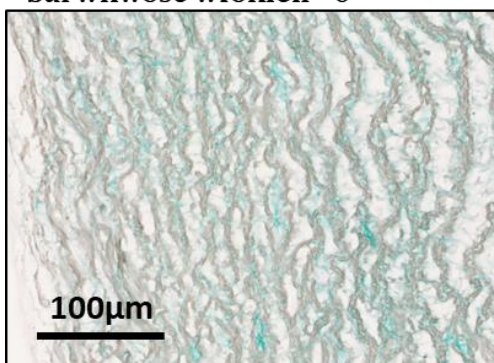
3.7.2 Barwienie hematoksyliną i eozyną

Barwienie hematoksyliną i eozyną (HE) jest standardowym topograficznym barwieniem przeglądowym. Pozwala ocenić całościowo struktury tkanki poprzez kontrastowe barwienie jąder komórkowych na kolor fioletowy i cytoplazmy na kolor różowy. Barwienie to posłużyło do oceny efektywności stopnia decelularyzacji tkanek. Ocenie poddano liczbę jąder komórkowych w polu widzenia (obraz tkanki widziany pod mikroskopem w powiększeniu 100x). W celu wykonania barwienia uwodnione skrawki na szkiełku podstawowym umieszczano w roztworze hematoksyliny wg Harissa na czas 5 minut. Preparaty kolejno płukano 5 minut pod bieżącą wodą oraz w wodzie destylowanej. Następnie szkiełka zanurzano na 5 minut w 2% roztworze eozyny. Preparaty poddawano odwodnieniu w roztworach w kolejności: alkohol etylowy 80%, 2x alkohol etylowy absolutny, 2x ksylen i nakrywano szkiełkiem nakrywkowym z zastosowaniem DPX. Obserwację próbek przeprowadzano przy pomocy mikroskopu świetlnego (Observer. Z1, Carl Zeiss, Niemcy).

3.7.3 Barwienie metodą Massona

Metoda barwienia wg Massona barwi struktury macierzy zewnątrzkomórkowej takie jak kolagen na kolor zielony, włókna mięśniowe na czerwono oraz jądra komórkowe na kolor brązowy. Preparaty inkubowano 15 minut w roztworze hematoksyliny wg Mayera, następnie szkiełka płukano 5 minut pod bieżącą wodą oraz przez minutę w wodzie destylowanej. Próbki zanurzono na 5 minut w roztworze pąsu ksylidynowego (skład zaprezentowano w Tab. 3 – 3, punkt 10) i wypłukano w wodzie destylowanej. W kolejnym etapie materiał inkubowano 5 minut w 1 % kwasie fosforomolibdenowym oraz przez 6 minut w 2 % zieleni świetlistej sporządzonej na bazie 1 % kwasu octowego. Proces płukania preparatów w wodzie destylowanej powtórzono i poddano je odwodnieniu w szeregu alkoholowym (identycznym jak w punkcie 3.7.2.). Po odparowaniu alkoholu nakrywano szkiełkiem nakrywkowym z zastosowaniem DPX. Barwliwość włókien kolagenowych oceniono według czterostopniowej skali (0-3) zaprezentowanej na Ryc. 3 – 2. Preparaty obserwowano przy pomocy mikroskopu świetlnego (Observer. Z1, Carl Zeiss, Niemcy), zdjęcia wykonano wykorzystując skaner o wysokiej rozdzielczości (NanoZoomer 2.ORS, Hamamatsu, Japonia)

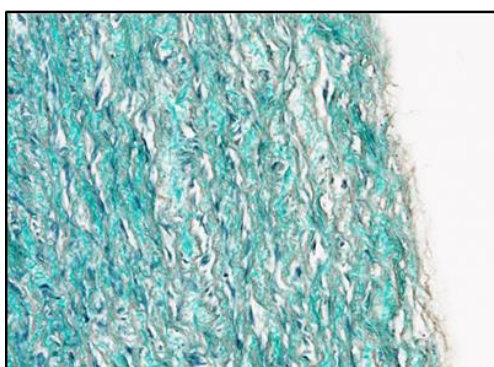
Wynik negatywny, słaba barwliwość włókien - 0



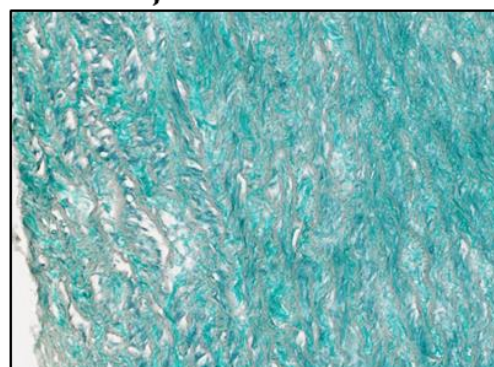
Umiarkowana barwliwość włókien - 1



Wysoka barwliwość włókien - 2



Wysoka barwliwość włókien o zwartej strukturze - 3

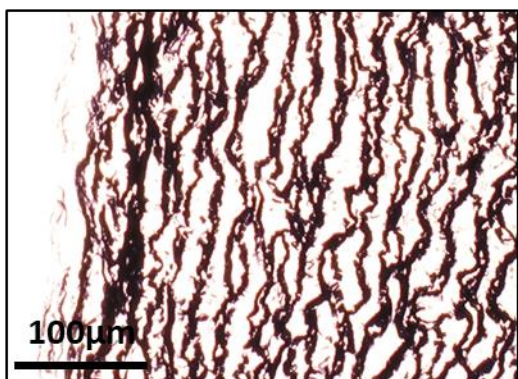


Ryc. 3-2 Przykładowe obrazy histologiczne naczyń zastawki pnia płucnego wybarwione techniką wg Massona. Zielony kolor i jego intensywność wskazuje na obecność włókien kolagenowych w tkance.

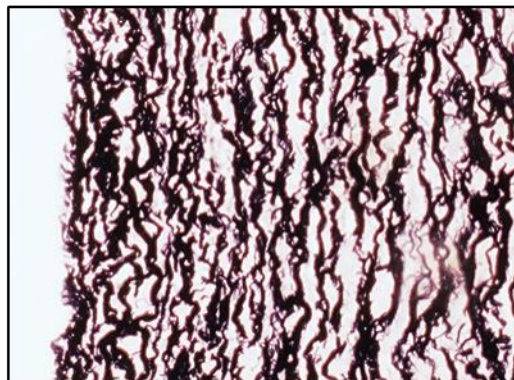
3.7.4 Barwienie metodą Verhoeff-van Giesona (VEG)

Barwienie stosowane do zobrazowania włókien kolagenowych, elastynowych oraz miocytów. Preparaty poddano 40 minutowej kąpieli w roztworze hematoksyliny Varhoeff'a przygotowanej świeżo przed użyciem (skład w Tab. 3 – 3, punkt 9) oraz płukano przez 5 minut pod bieżącą wodą. Szkiełka zanurzono na około 1 minutę w 2% roztworze chlorku żelaza po czym płukano 5 minut w wodzie destylowanej. Następnie preparaty inkubowano 5 minut w 5 % roztworze tiosiarczanu sodu, proces płukania w wodzie destylowanej powtórzono. Preparaty poddano 8 minutowej inkubacji w roztworze van Giesona, a następnie odwodniono w szeregu alkoholowym (identycznym jak w punkcie 3.7.2.) i zakrywano szkiełkiem nakrywkowym z użyciem DPX. Obecność włókien elastynowych oceniono według czterostopniowej skali (0-3) zaprezentowanej na Ryc. 3 – 3. Preparaty obserwowano przy pomocy mikroskopu świetlnego (Observer. Z1, Carl Zeiss, Niemcy). Zdjęcia wykonano wykorzystując skaner o wysokiej rozdzielczości (NanoZoomer 2.0RS, Hamamatsu, Japonia).

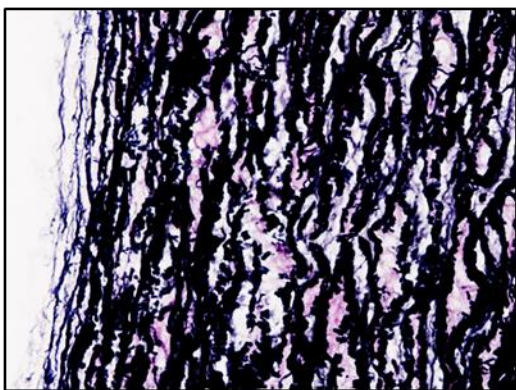
**Wynik negatywny, słaba
barwliwość włókien - 0**



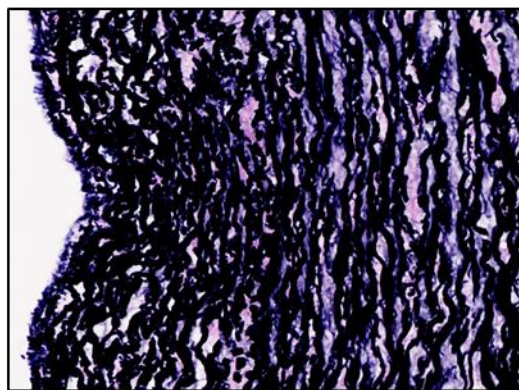
**Umiarkowana barwliwość
włókien - 1**



**Wysoka barwliwość
włókien - 2**



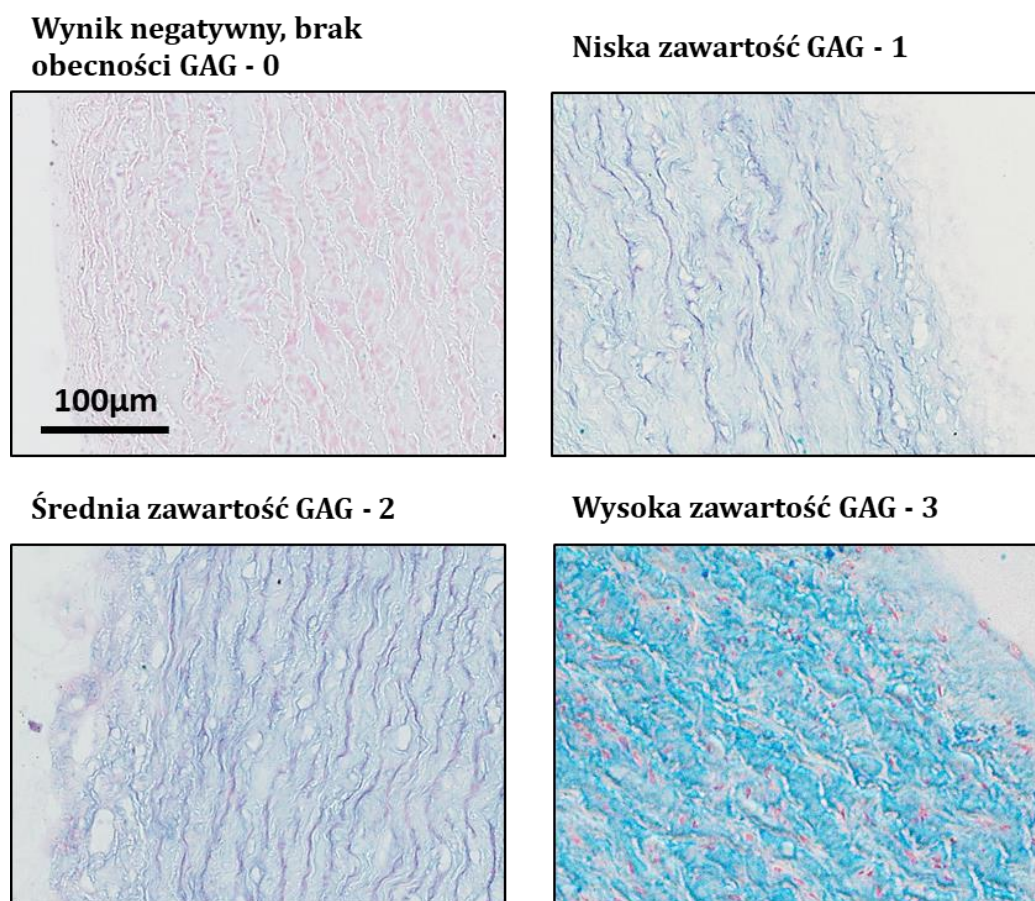
**Wysoka barwliwość włókien
o zwartej strukturze - 3**



Ryc. 3-3 Przykładowe obrazy histologiczne naczyń zastawki pnia płucnego wybarwione techniką wg Verhoeff–van Giesona. (VEG) Ciemno fioletowy lub czarny kolor i jego intensywność wskazują na obecność włókien elastynowych w tkance.

3.7.5 Barwienie z użyciem błękitu alcjanowego (ALB)

Błękit alcjanowy barwi kwaśne mukopolisacharydy i glikozaminoglikany na kolor niebieski. Do wykonania preparatów wykorzystano zestaw komercyjnie dostępnych odczynników - Alcian Blue pH 2,5. Na szkiełka z preparatami naniesiono po 10 kropli błękitu alcjanowego o pH 2,5 wg Mowry'ego oraz przykryto szkiełkiem nakrywkowym na 30 minut w celu uniknięcia ich wyschnięcia. Następnie na preparaty nakropiono 10 kropli tetraboranu sodu oraz inkubowano 10 minut. Preparaty wypłukano w wodzie destylowanej, po czym naniesiono 10 kropli roztworu carmalum Mayera, który pozostawiono na 5 minut. Szkiełka płukano następnie w wodzie destylowanej i odwadniano w szeregu alkoholowym. Preparaty zamykano z zastosowaniem DPX. Obecność glikozaminoglikanów oceniono według czterostopniowej skali (0-3) zaprezentowanej na Ryc. 3 - 4. Preparaty obserwowano przy pomocy mikroskopu świetlnego (Observer. Z1, Carl Zeiss, Niemcy). Zdjęcia wykonano wykorzystując skaner o wysokiej rozdzielczości (NanoZoomer 2.0RS, Hamamatsu, Japonia).



Ryc. 3-4 Przykładowe obrazy histologiczne naczyń zastawki pnia płucnego wybarwione błękitem alcjanowym (ALB). Niebieski kolor i jego intensywność wskazują na obecność i ilość glikozaminoglikanów (GAG) w tkance.

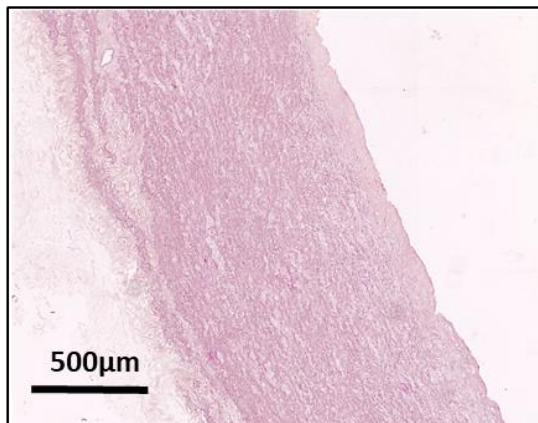
3.8 Ocena stopnia kalcyfikacji matryc w teście *in vitro*

Aby zbadać skłonność modyfikowanych tkanek do odkładania się złogów wapnia przeprowadzono test w warunkach *in vitro*. W teście zbadano następujące grupy badawcze: matryce decelularne, matryce sieciowane GA, tkanki natywne oraz tkanki natywne sieciowane analogicznymi roztworami GA do matryc decelularnych. Próbki inkubowano w sterylnym roztworze kalcyfikującym (dokładny skład przedstawiono w Tab. 3 – 3, punkt 13), symulującym skład jonowy ludzkiej krwi w 37 °C przez 21 dni. Przed umieszczeniem tkanek w roztworze klasyfikującym pobierano z nich fragmenty do wstępnej analizy histologicznej, w celu sprawdzenia czy dana tkanka nie wykazywała cech zwapnienia przed przeprowadzonym testem. Matryce pozyskane z naczyń cięto na fragmenty o powierzchni 2 cm², w przypadku płatków zastawek 1 płatek stanowił pojedynczą próbkę. Na fragment naczynia przypadało 10 mL roztworu kalcyfikującego, każdy płatek natomiast inkubowano w objętości 5 mL. Po 21 dniach próbki poddano analizie histologicznej z zastosowaniem barwienia czerwieni alizarynową S (opis barwienia paragraf 3.8.1).

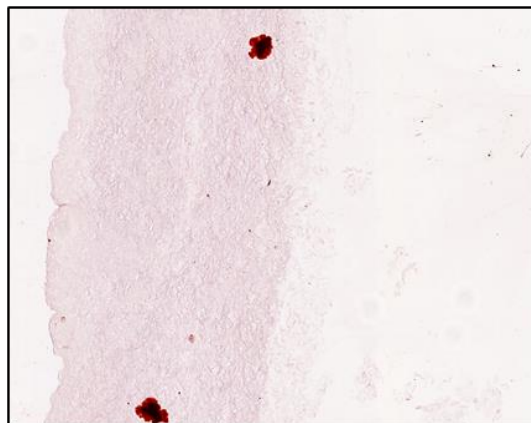
3.8.1 Obrazowanie złogów wapnia za pomocą barwienia czerwieni alizarynową S

W celu wykonania barwienia próbki przygotowano według standardowej procedury utrwalania preparatów histologicznych opisanych w paragrafie 3.7.1. Po odparafinowaniu i uwodnieniu w szeregu alkoholowym i wodzie destylowanej, szkiełka z preparatami zanurzano na 5 minut w roztworze Alizarin Red S. Próbki odsączono i 20 krotnie zanurzano w acetonie, po czym tą samą czynność powtórzono stosując mieszaninę acetonu z ksylenem (w stosunku 1:1). W ostatnim etapie szkiełka inkubowano 10 minut w ksylenie, wymieniając po 5 minutach ksylen na świeży i zamykano szkiełkami nakrywkowymi z użyciem DPX. Obserwację prowadzono za pomocą mikroskopu świetlnego. W barwieniu tym złogi wapniowe obecne w próbce obserwuje się w postaci ognisto - czerwonych, ognisto - pomarańczowych lub ciemnoczerwonych strąków, pozostałe elementy tkanki wybarwione są na bladoróżowy lub żółty kolor. Stopień wapnienia tkanki oceniano w skali czterostopniowej (0 – 3) według skali przedstawionej na Ryc. 3 – 5.

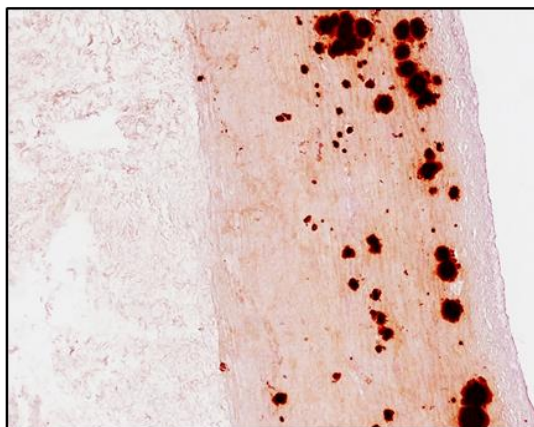
**Wynik negatywny, brak złogów
wapnia - 0**



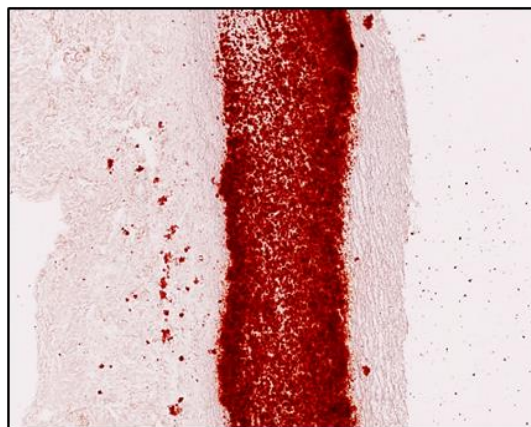
**Pojedyncze złogi wapnia w polu
widzenia - 1**



**Złogi wapnia zajmujące nie więcej niż
25% w polu widzenia preparatu - 2**



**Złogi wapnia zajmujące więcej niż 25%
w polu widzenia preparatu - 3**



Ryc. 3-5 Zdjęcia przedstawiają preparaty histologiczne wybarwione czerwienią alizarynową S. Czerwony kolor i jego intensywność wskazuje na obecność i ilość złogów wapnia w tkance.

3.9 Badanie oporności decelularnych matryc modyfikowanych aldehydem glutarowym na degradację enzymatyczną z zastosowaniem kolagenazy II

Testy przeprowadzono na decelularnych matrycach, decelularnych matrycach traktowanych aldehydem glutarowym oraz tkankach natywnych. Do badań wykorzystano próbki naczyń o powierzchni 2 cm^2 i całe płatki. Przed umieszczeniem tkanek w roztworze enzymu fragment tkanki pobierano w celu analizy histologicznej. Próby naczyń i płatków inkubowano odpowiednio w 5 mL oraz 2 mL roztworu kolagenazy II o aktywności $10\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (skład zaprezentowano w Tab. 3 – 3, punkt 14) przez 1,5 h w 37°C . Po inkubacji próbki umieszczono w 4% formaldehydzie i przygotowano preparaty histologiczne do barwienia wg Massona. Tkanki oceniano w skali 0-3 (Ryc. 3 – 2).

3.10 Hodowla komórek śródbłónka.

W badaniach cytotoksyczności i zasiedlania komórkowego zastosowano linię komórkową ludzkich komórek śródbłónka wyizolowaną z żyły pępowinowej człowieka (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells – HUVEC). Komórki hodowano w naczyniach polistyrenowych o powierzchni 75 cm^2 w medium przeznaczonym do hodowli komórek śródbłónka suplementowanym surowicą, antybiotykami, czynnikami wzrostu oraz heparyną (skład pożywki opisano w tabeli 3, punkt 15). Hodowlę komórek HUVEC prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C , gdzie zawartość CO_2 w atmosferze wynosiła 5%, a wilgotność była nie niższa niż 95% (Panasonic MCO-170AICUVH-PE, Japonia). Pożywkę hodowlaną wymieniano na świeżą co 2 – 3 dni. Gdy komórki pokrywały 80% powierzchni naczynia hodowlanego pasażowano je czyli przenoszono do nowych naczyń w ilości $2,5 \times 10^3 \cdot \text{cm}^{-2}$. W tym celu komórki traktowano 2 mL 0,25% roztworem Trypsyny z EDTA w temperaturze 37°C do momentu zaobserwowania pod mikroskopem świetlnym oderwania się komórek od podłoża, komórki w tej fazie wykazują okrągły kształt. Działanie trypsyny neutralizowano 2 mL medium hodowlanego zawierającego surowicę. Zawiesinę komórek przenoszono do probówek i wirowano przy prędkości $180 \times \text{g}$ przez 7 minut (wirówka Eppendorf 5804 R, Niemcy). Supernatant usuwano z nad peletu natomiast pelet komórkowy rozcieńczano w 5 mL medium hodowlanego. Zawiesinę komórek przenoszono w liczbie $2,5 \times 10^3 \text{ komórek} \cdot \text{cm}^{-2}$ do nowych naczyń hodowlanych zawierających po 9,5 mL świeżej pożywki. Komórki hodowano nie dłużej niż do 12 pokolenia.

3.11 Ocena cytotoksyczności aldehydu glutarowego na komórki endotelialne - badanie cytotoksyczności pośredniej z ekstraktów.

3.11.1 Sporządzenie ekstraktów

Powszechną praktyką w badaniach oceny cytotoksyczności jest obserwacja reakcji hodowli komórkowych traktowanych ekstraktami pozyskanymi w trakcie wypłukiwania wyrobów o potencjalnie szkodliwym działaniu. W niniejszej pracy ekstrakty sporządzono na bazie

Tab. 3-2 Oznaczenia ekstraktów i rodzaj tkanki, z której ekstrakt został pozyskany

Rodzaj matrycy tkankowej	Oznaczenie ekstraktu pozyskanego z wypłukiwania matryc
D1p ; D1n	E1
D2p; D2n	E2
D1pGA1; D1nGA1	E1GA1
D1pGA2; D1nGA2	E1GA2
D1pGA3; D1nGA3	E1GA3
D2pGA1; D2nGA1	E2GA1
D2pGA2; D2nGA2	E2GA2
D2pGA3; D2nGA3	E2GA3

legenda:

- D1 – decelularyzacja enzymatyczna
- D2 – decelularyzacja detergentowa
- E – ekstrakt
- n – naczynie zastawki płucnej
- p – płatek zastawki płucnej
- GA1 – 0,0125% roztwór aldehydu glutarowego
- GA2 – 0,025% roztwór aldehydu glutarowego
- GA3 – 0,05% roztwór aldehydu glutarowego

decelularnych matryc D1 i D2 oraz traktowanych odpowiednimi roztworami aldehydu glutarowego fragmentów naczyń oraz płatków zastawki płucnej o powierzchni ~2 cm² każdy. Roztwory sporządzono zgodnie z normą PN-EN ISO 1993-12. Poszczególne grupy modyfikowanych tkanek inkubowano w objętości 100 mL suplementowanego medium odżywczego przeznaczonego do hodowli komórek śródbłonna. Do sporządzenia danego typu ekstraktu wykorzystano po 10 fragmentów naczyń o powierzchni 2 cm² oraz 3 płatki (każdy fragment pochodził z innej zastawki płucnej) co odpowiadało sumarycznej powierzchni pojedynczej zastawki. Wypłukiwanie prowadzono w 37 °C przy ciągłym wytrząsaniu orbitalnym (150 rpm) (wytrząsarka Eppendorf AG 22331, Niemcy) przez 72 h. Ekstrakty oznaczono symbolem E, poszczególne grupy przedstawiono w Tab. 3 – 2. Tak przygotowane roztwory stosowano do dalszych eksperymentów.

3.11.2 Hodowla komórek HUVEC z ekstraktami

Do badań cytotoksyczności pośredniej i sekrecji cytokin prozapalnych wykorzystano komercyjną linię komórek śródbłónka ludzkiego pozyskaną z żyły pępowinowej. W naczyniach 24 dołkowych umieszczono komórki w stężeniu $0,7 \cdot 10^5$ na dołek (o powierzchni 2 cm²), które inkubowano w medium hodowlanym przez 24 h w celu osiągnięcia właściwej adhezji komórek do naczynia hodowlanego. Po tym czasie medium hodowlane zastąpiono odpowiednimi ekstraktami. Każdą z prób wykonano w 6 powtórzeniach. Komórki z ekstraktami inkubowano przez 24 h. Następnie pobierano medium hodowlane z nad hodowli do plastikowych probówek o pojemności 2 mL i przechowywano w temperaturze – 80°C w celu ilościowej analizy sekrecji cytokin przez komórki endotelialne traktowane danym roztworem. Po pobraniu ekstraktów komórki analizowano pod kątem ich morfologii oraz cytoszkieletu stosując barwienie falloidyną, wimentyną oraz DAPI (opisane w paragrafie 3.11.4.). Dodatkowo za pomocą cytometru przepływowego oszacowano liczbę komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych (paragraf 3.11.5.)

3.11.3 Badanie odpowiedzi komórkowej na ekstrakty modyfikowanych tkanek

Odpowiedź komórkową na zadane stężenia GA badano między innymi na podstawie ilościowej oceny sekrecji cytokin prozapalnych IL-6 oraz IL-8. Interleukina 6 charakteryzuje się działaniem pleiotropowym, uznawana jest za jeden z kluczowych czynników regulujących mechanizmy obronne. Bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, reakcji zapalnej oraz w krwiotworzeniu. Jest stymulatorem wytwarzania białek ostrej fazy w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek. Interleukina 8, jedna z najlepiej poznanych chemokin, jest mieszaniną dwóch polipeptydów ser-IL-8 oraz ala-IL-8. Komórki śródbłónka wytwarzają głównie ala-IL-8. Interleukina 8 pełni rolę mediatora w kaskadzie procesu zapalnego i jest głównym chemoatraktantem neutrofilów, które odgrywają kluczową rolę w indukcji i podtrzymaniu miejscowego i ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Aby dokonać pomiaru ilości uwalnianych cytokin przez komórki śródbłónka ekstrakty pobrane z nad hodowli komórkowych po 24h poddano testom immunoenzymatycznym – ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay). Do tego celu wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy, a analizę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (IL-6: Fine Biotech Co., Ltd., Chiny; IL-8: Biolegend, USA).

3.11.4 Ocena cytoszkieletu komórek śródbłónka traktowanych ekstraktami tkankowymi.

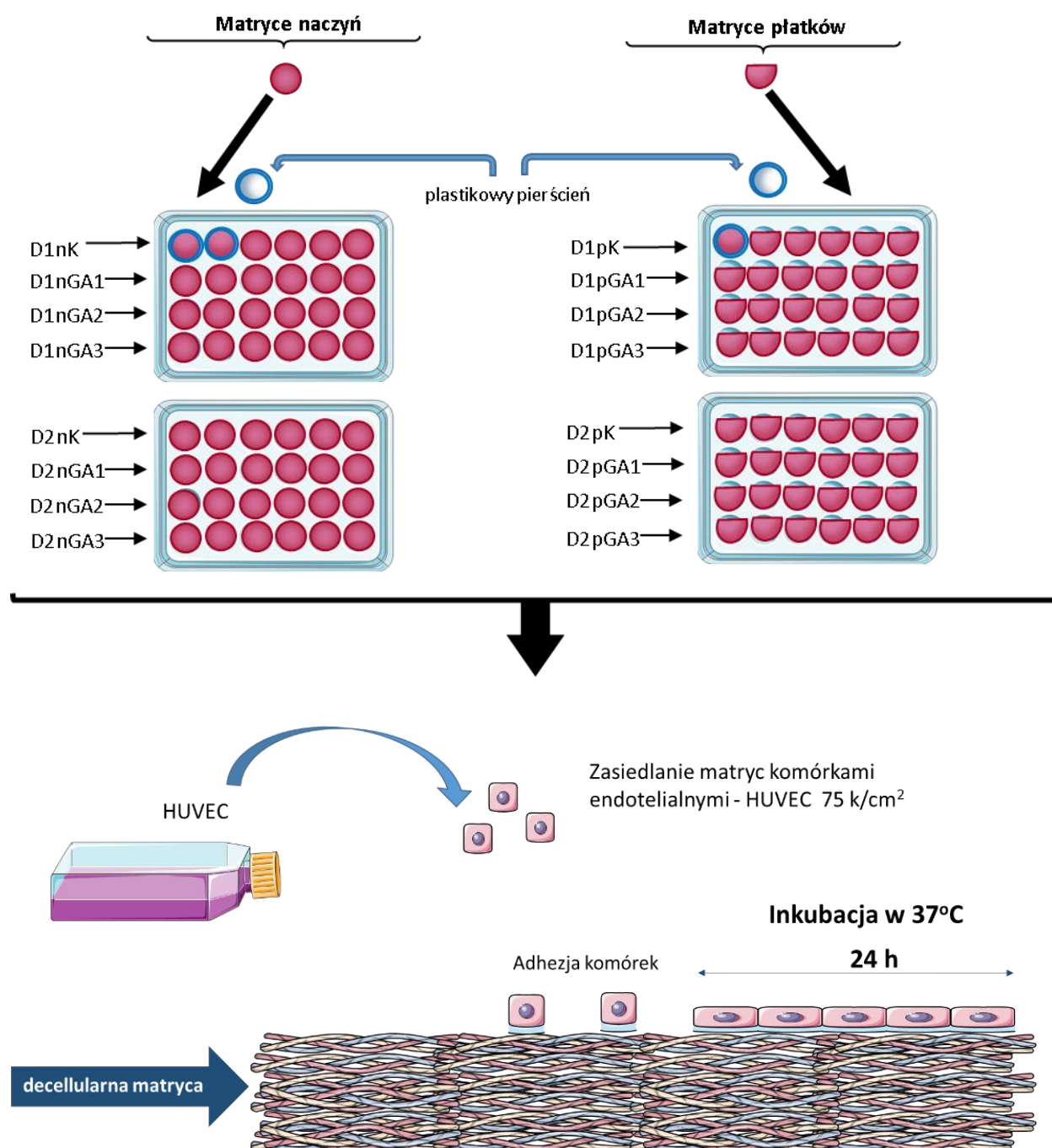
W celu wyznakowania filamentów aktynowych i pośrednich komórki przepłukano roztworem PBS, następnie utrwalono 4% roztworem formaldehydu i pozostawiono 10 minut w temperaturze pokojowej. Etap płukania w PBS powtórzono dwukrotnie i zalano komórki 0,1% Tritonem X-100 o temperaturze 4 °C, z którym inkubowano je kolejne 10 minut. Po dwukrotnym przepłukaniu w PBS do naczyń dodano przeciwciało przeciw wimentynie koniugowane z fikoerytryną (PE) w stężeniu $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, roztwór DAPI ($2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) oraz roztwór falloidyny ($2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$). Po upływie 24 godzin wybarwione komórki płukano ponownie PBS i obserwowano z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej (Carl Zeiss, Observer. Z1, Niemcy). W obrazie mikroskopowym filamenty aktynowe identyfikowano jako wykazujące zieloną fluorescencję, filamenty pośrednie wykazywały fluorescencję czerwoną natomiast jądra komórkowe barwione przy użyciu DAPI widoczne były jako fluorescencja niebieska.

3.11.5 Badanie żywotności komórek śródbłónka użyciem techniki cytometrii przepływowej

Do oceny żywotności komórkowej zastosowano aneksynę V znakowaną fluorochromem FITC oraz jodek propidyny. Aneksyna V posiada zdolność wiązania się z fosfatydyloseryną, która występuje po zewnętrznej stronie błony komórek apoptotycznych. W komórkach żywych natomiast fosfolipid ten umiejscowiony jest po wewnętrznej stronie błony, co uniemożliwia jego wiązanie z aneksyną V. Z kolei jodek propidyny przedostaje się przez naruszoną błonę komórek martwych i późnoapoptotycznych co umożliwia ich wyznakowanie. Do badań wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw, który składał się z następujących roztworów: buforu wiążącego, aneksyny V i jodku propidyny. Ekstrakty z hodowli komórkowej zlewano, a komórki płukano dwukrotnie 4 mL PBS. Następnie komórki traktowano 2% roztworem trypsyny, aż do momentu ich zaokrąglenia i oderwania się od podłoża naczynia hodowlanego. Trypsynę neutralizowano medium hodowlanym. Zawiesinę komórkową przenoszono do próbek wirówkowych i wirowano 7 minut ($180 \times g$). Supernatant zlewano natomiast pelet rozcieńczano w 500 μL buforu. Następnie komórki liczone przy użyciu komory Bürkera. Po oszacowaniu liczby, porcję komórek $1 \cdot 10^5$ zawieszono w 500 μL buforu wiążącego. Do próbek badanych dodano po 5 μL aneksyny V oraz 5 μL jodku propidyny i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem. Po inkubacji pomiar wykonano przy użyciu cytometru przepływowego (Beckman Coulter, USA).

3.12 Zasiedlanie matryc komórkami śródbłónka – ocena cytotoksyczności bezpośredniej

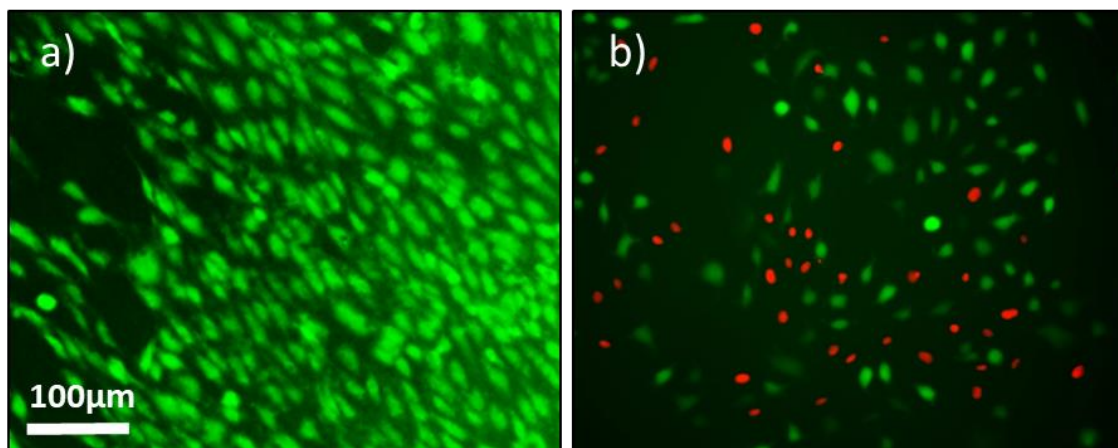
W badaniu cytotoksyczności bezpośredniej wykorzystano matryce decelularne oraz modyfikowane aldehydem glutarowym. Skafoldy pozyskane z naczyń oraz płatków o powierzchni 2 cm² umieszczono w naczyniu 24 dołkowym. Matryce unieruchomiono i zabezpieczono przed przemieszczaniem się ich w dołkach naczynia za pomocą plastikowego pierścienia. Na każdą z matryc nakrapiano po 1,5 mL medium hodowlanego i inkubowano przez 24 h w warunkach hodowli komórkowych (37 °C, 90% wilgotność, 5% CO₂) w celu penetracji medium w struktury matrycy. Następnego dnia medium usuwano i nakrapiano po 150 000 komórek HUVEC zawieszonych w 200 µL pożywki na powierzchnię każdej z matryc, inkubowano 1 h w warunkach hodowli komórkowych (Ryc. 3 – 6). Po godzinie do hodowli dodano po 2 mL medium hodowlanego i inkubowano w tych samych warunkach przez kolejne 24 h. Liczbę komórek zaadherowanych, żywych oraz nekrotycznych oceniano z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystując barwienie przyżyciowe z zastosowaniem jodku propidyny (PI) i dioctanu fluoresceiny (FDA)(paragraf 3.12.1.).



Ryc. 3-6 Schemat przedstawiający rozmieszczenie próbek modyfikowanych matryc w naczyniach 24 dołkowych.
<https://smart.servier.com>

3.12.1 Barwienie jodkiem propidyny (PI) i dioctanem fluoresceiny (FDA)

Test z użyciem PI i FDA jest jedną z powszechnie stosowanych metod badania cytotoksyczności. Lipofilny FDA przenika przez nienaruszoną błonę komórkową, w żywej i aktywnej metabolicznie komórce. Dioctan fluoresceiny rozkładany jest przez esterazy komórkowe do fluoresceiny – substancji lipofobowej, co zapobiega jej wypływowi z wnętrza komórki. Fluoresceina, która gromadzi się w cytoplazmie żywych komórek, jest substancją fluorescencyjną, która pod wpływem wzbudzenia światłem niebieskim daje sygnał zielony. Jodek propidyny natomiast przenika do wnętrza komórki tylko w przypadku naruszenia ciągłości błony komórkowej. Po przedostaniu się do cytoplazmy znakuje kwasy nukleinowe i po wzbudzeniu światłem zielonym wybarwia jądro komórki nekrotycznej na kolor czerwony. W celu oceny cytotoksyczności zastosowanych stężeń GA na każdą matrycę tkankową aplikowano roztwór FDA (przygotowywany w dniu użycia) o końcowym stężeniu $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (skład zaprezentowano w Tab. 3 – 3, punkt 11). Próbki inkubowano w ciemności w temperaturze 37°C przez 15 minut. Następnie do mieszaniny dodawano roztwór jodku propidyny o końcowym stężeniu $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tab. 3 – 3, punkt 12) i inkubowano w tych samych warunkach kolejne 2 minuty. Odczytu wyników poszczególnych prób dokonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego używając programu AxioVision Rel. 4.8. Z wykonanych zdjęć dokonano kalkulacji liczby komórek żywych oraz nekrotycznych, które policzono za pomocą programu Image J1.46R (Ryc. 3 – 7).



Ryc. 3-7 Zdjęcia przedstawiają komórki śródbłónka wybarwione dwuocetanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propidyny (PI). a) zielony kolor - komórki żywe; b) czerwony kolor - komórki martwe.

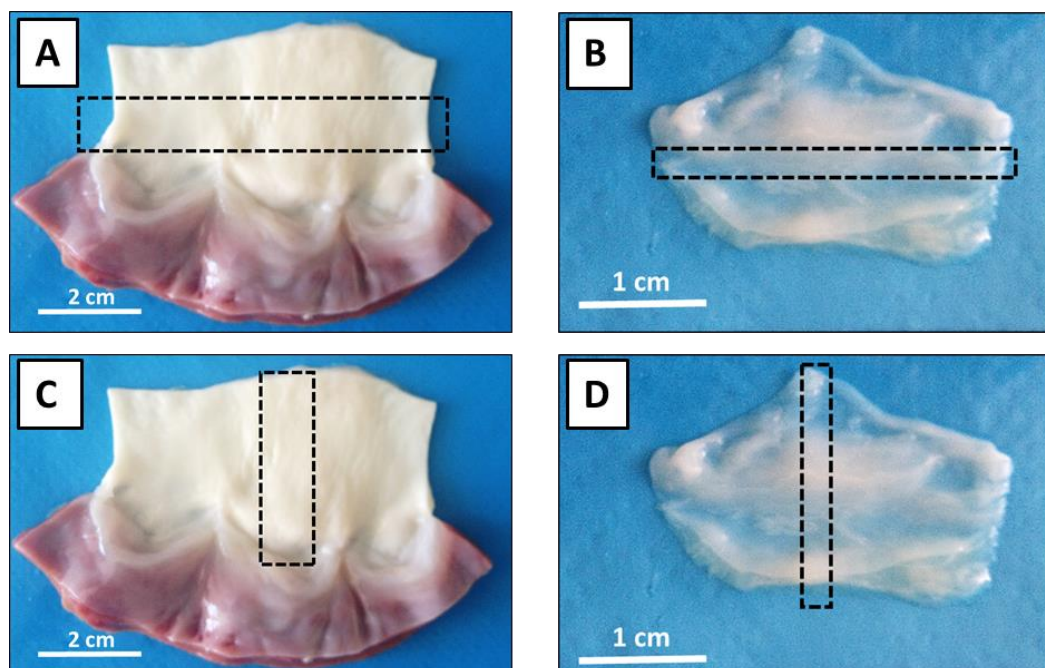
3.13 Ocena wybranych właściwości mechanicznych decelularnych matryc traktowanych aldehydem glutarowym

W celu oceny wybranych parametrów mechanicznych decelularnych matryc przeprowadzono statyczną próbę jednoosiowego rozciągania próbek. Próbki były rozciągane do momentu ich zerwania w kierunku obwodowym – przeciwnym do przepływu krwi przez zastawkę oraz w kierunku promieniowym zgodnym z przepływem krwi. W teście oceniono następujące parametry:

- Odształcenie względne przy maksymalnym naprężeniu próbki (ang. strain at peak)
- Moduł elastyczności (ang. elastic modulus i secant modulus)
- Wytrzymałość na rozciąganie (ang. peak stress)
- Energię w punkcie maksymalnego naprężenia (ang. energy to peak)
- Naprężenie w momencie zerwania próbki (ang. break stress)

3.13.1 Przygotowanie próbek do testów mechanicznych

Testom poddano matryce decelularne, decelularne traktowane GA oraz tkanki natywne, które stanowiły kontrolę dla powyższych grup (grupy poddane testom zaprezentowano w Tab. 3-1). Ponieważ zarówno tkanka naczynia jak i płątka posiada strukturę anizotropową, próbki były wycinane zawsze w tym samym miejscu (sposób wycinania prób przedstawiono na Ryc. 3 - 8). W przypadku naczyń wykorzystano fragmenty o wymiarach 4cm / 1cm natomiast z płatków wycinano fragment 20mm / 2mm. W kierunku obwodowym z naczyń wycinano fragment 2 mm nad komisurami, w kierunku promieniowym próbkę do badań pobierano w miejscu wyznaczonym przez płatek przedni zastawki. Z płatków zastawki w kierunku obwodowym i promieniowym pobierano fragment w środkowej części płatka o największej jego długości. Wymiary próbek do badań ustalono tak aby uniknąć usztywnienia próbek przy uchwytach. Przy zbyt krótkiej próbce usztywnienie przenosi się na całą powierzchnię próbki, co może powodować pozorny wzrost modułu elastyczności tkanki. Długości oraz szerokości próbek ustalano za pomocą elektronicznej suwmiarki (Yato, Polska), a ich grubość była mierzona za pomocą elektronicznego grubościomierza (Fowler Sylvac, Ultra Digit Mark IV, Szwajcaria). Pomiar wykonywano w temperaturze pokojowej przy stałej wilgotności powietrza, próbki utrzymywano w stanie ciągłego zwilżenia.



Ryc. 3-8 Na zdjęciach zaznaczono prostokątami miejsce wycinania próbki do testów mechanicznych w kierunku obwodowym A – dla naczyń, B – dla płatków oraz promieniowym C – dla naczyń, D – dla płatków.

3.13.2 Wykonanie statycznej próby rozciągania

Statyczną próbę jednoosiowego rozciągania dla poszczególnych próbek wykonano na stanowisku do badań wytrzymałościowych, w skład którego wchodziła maszyna wytrzymałościowa (Tytron 250 Microforce Testing System MTS, MTS Systems Corporation, USA), video ekstensometr do pomiaru odkształcenia próbki (Video Extensometers NG wersja 5.15.5.0 Messphysik wyposażony w kamerę Blue FOX), komputer z programem do obsługi maszyny wytrzymałościowej (MTS System Corporation). Przed pomiarem określano parametry testu:

- a) czułość na zerwanie – 90%
- b) wstępną wartość przyłożonej siły, przy której rozpoczynał się test – 0,250 N dla naczyń oraz 0,150 N dla płatków
- c) prędkość z jaką próbka była rozciągana – $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ dla naczyń, $5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ dla płatków

Próbki umieszczane były w uchwytach maszyny wytrzymałościowej. W celu uniknięcia wyslizgiwania się tkanek z uchwytów, końce próbek zawijano w gazę. Określano grubość próbki oraz ich długość początkową. Następnie próbkę rozciągano ze stałą prędkością do momentu jej całkowitego zerwania. Program komputerowy rejestrował wartości siły wydłużającej próbkę oraz jej wydłużenie. Chwilowa siła rozciągająca była mierzona z częstotliwością 0,1s. W wyniku przeprowadzonej statycznej próby rozciągania otrzymano

wykresy zależności naprężenia od odkształcenia dla wszystkich badanych próbek. Analizy danych liczbowych dokonano za pomocą programu TestWorks (MTS).

3.13.3 Obliczanie wartości naprężenia w próbie rozciągania

Naprężenie (σ) wywołane jest przez siłę (F), która działa na powierzchnię (A) próbki. Siła działająca prostopadle do powierzchni próbki powoduje pojawianie się w niej naprężeń normalnych. Wartość tego naprężenia opisuje się jako siłę podzieloną przez pole powierzchni przekroju poprzecznego próbki.

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Jednostką naprężenia jest niuton na metr kwadratowy (N/m^2) co odpowiada wartości ciśnienia 1 paskala (Pa). W badaniach właściwości mechanicznych matryc naprężenie było obliczane na podstawie rejestrowanej podczas testu siły działającej na próbkę oraz wartości jej przekroju poprzecznego. Ponieważ powierzchnia przekroju próbki była obliczana przez program Test Works na podstawie wartości grubości i szerokości zmierzonych przed testem, obliczone naprężenie ma wartość umowną, a nie rzeczywistą.

3.13.4 Obliczanie odkształcenia względnego w punkcie maksymalnego naprężenia próbki.

W odpowiedzi na naprężenia materiały ulegają odkształceniu. Aby opisać odkształcenie należy wyróżnić dwa stany próbki: początkowy i końcowy. Na podstawie różnicy w położeniach punktów w tych dwóch stanach można wyznaczyć liczbową wartość odkształcenia. Odkształcenie względne opisywane jest jako zmiana długości próbki w stosunku do jej długości początkowej.

$$\varepsilon = \frac{(l_k - l_0)}{l_0}$$

ε – odkształcenie względne

l_k – długość końcowa

l_0 – długość początkowa

Odkształcenie względne jest wartością bezwymiarową, często podawane jest w procentach.

$$\varepsilon = \frac{(l_k - l_0)}{l_0} \times 100\%$$

Podczas rozciągania próbki dochodzi do zmiany długości próbki w kierunku działającej na nią siły (wydłużenie względne) oraz prostopadłym do tej siły (przewężenie względne).

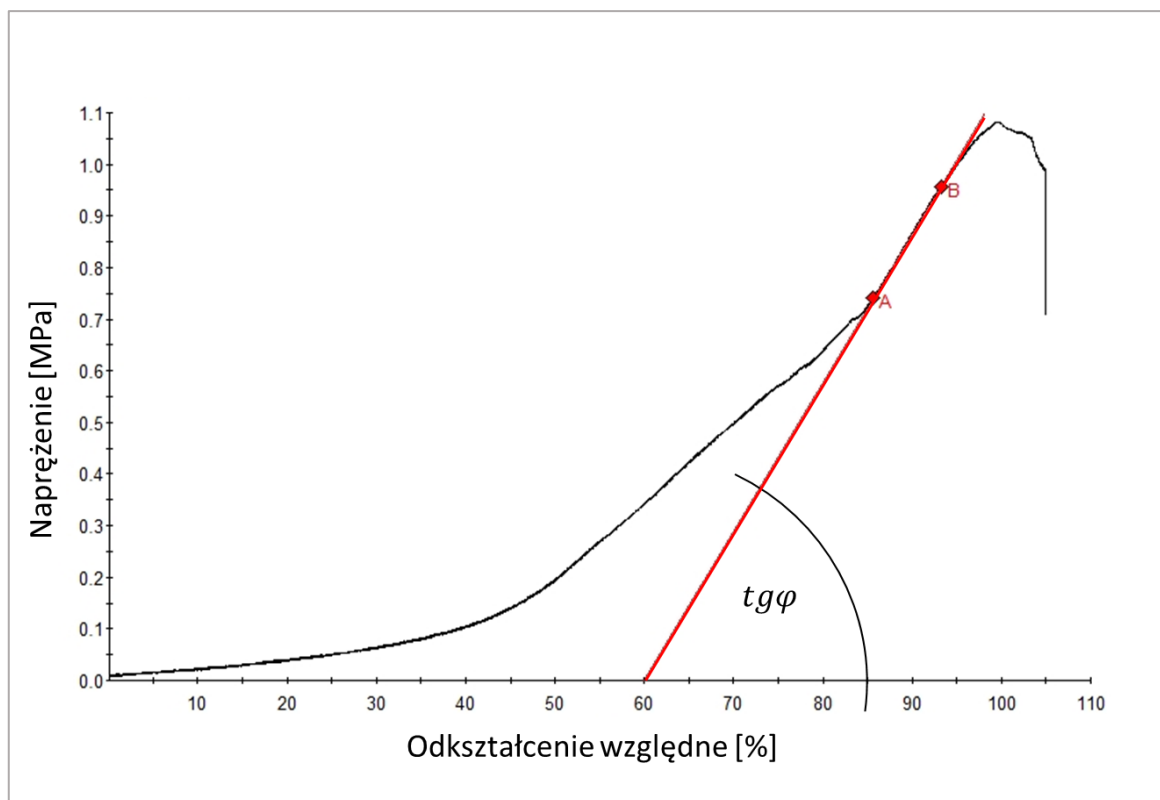
W trakcie testu badania mechanicznych właściwości matryc, za pomocą oprogramowania komputerowego określono wydłużenie względne, które przedstawiono jako procentowy przyrost długości próbki względem jej długości początkowej w momencie jej największego naprężenia.

3.13.5 Pomiar modułu elastyczności

Naczynia krwionośne należą do grupy miękkich tkanek, nie podlegają prawu Hooke'a, charakteryzują się nieliniową relacją naprężenia do odkształcenia. Moduł sprężystości (współczynnik sprężystości) wyznaczany jest na podstawie ilorazu wartości naprężenia do odkształcenia sprężystego, spowodowanego przez to naprężenie wyrażone w megapaskalach (MPa). Współczynnik ten charakteryzuje odporność materiału na odkształcenia, który jest charakterystyczny i odmienny dla różnych typów materiałów. Zależność względnego odkształcenia liniowego ε materiału (w zakresie odkształceń sprężystych) od naprężenia (σ) jakie w nim występuje nazywane jest modułem sprężystości podłużnej lub modułem Younga (E). Jednostką modułu Younga jest paskal (Pa).

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Ponieważ tkanki nie są materiałami sprężystymi, które odkształcają się w sposób odwracalny, a lepkosprężystymi pomiar modułu dla tkanek w zakresie odkształceń odwracalnych jest umowny. Moduł elastyczności w przeprowadzonych badaniach matryc zastawki płucnej wyznaczono na podstawie próby rozciągania. Na podstawie zarejestrowanej przez program wartości siły i wydłużenia oraz powierzchni pola przekroju próbki w programie TestWorks sporządzono wykresy zależności naprężenia nominalnego od wydłużenia względnego. Moduł sprężystości był obliczany przez program z użyciem dwóch metod: metodą najdłuższego prostoliniowego odcinka oraz metodą sieczną dla wydłużenia względnego 5%. W pierwszym przypadku z zastosowaniem oprogramowania komputerowego znajdowano najdłuższy prostoliniowy odcinek, z wyznaczonej prostej wyznaczano moduł elastyczności obliczając tangens (tg) kąta φ nachylenia prostej do osi wydłużenia względnego (graficzny sposób wyznaczania modułu sprężystości przedstawiono na Ryc. 3 – 9).



Ryc. 3-9 Przykładowy wykres napężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym najdłuższym prostoliniowym odcinkiem ograniczonym punktami A, B oraz kątem nachylenia prostej do osi odkształcenia względnego.

Z powyższego wykresu wynika, iż:

$$tg\varphi = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Z założenia, iż odkształcenie jest proporcjonalne do napężenia można zapisać równanie:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

Uwzględniając obie powyższe zależności można zapisać, że:

$$tg\varphi = E$$

Tangens kąta wyznaczonej prostej i osi wydłużenia względnego stanowi moduł sprężystości, nazywany również modułem Younga. W przeprowadzonych badaniach zastosowano również metodę sieczną, która umożliwia wyznaczenie modułu dla pewnej umownej wartości odkształcenia materiału. Na krzywej naprężenia od odkształcenia wyznaczano na osi x punkt (M) dla wydłużenia względnego wynoszącego 5 %, przez który przeprowadzano prostą. Tangens kąta φ nachylenia tej prostej stanowił sieczny moduł odkształcenia (graficzny sposób wyznaczania modułu siecznego przedstawiono na Ryc. 3 – 10).

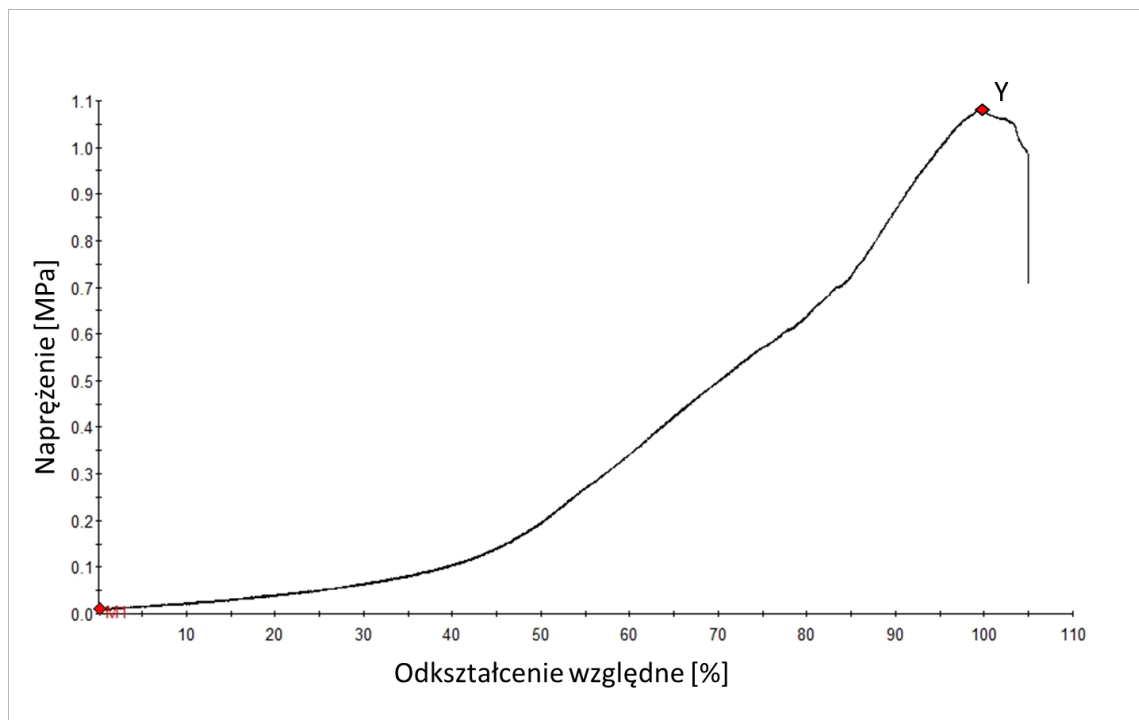


Ryc. 3-10 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym punktem M, przez który przeprowadzono prostą oraz kątem nachylenia tej prostej do osi odkształcenia względnego.

3.13.6 Wyznaczanie wytrzymałości na rozciąganie

Na podstawie statycznej próby rozciągania wyznaczono wytrzymałość na rozciąganie matryc naczyń oraz płatków. Z otrzymanej krzywej naprężenia/ odkształcenia względnego wyznaczano punkt (Y), w którym naprężenie odpowiadało największej sile rozciągającej próbkę podczas testu odniesionej do początkowego pola powierzchni przekroju próbki.

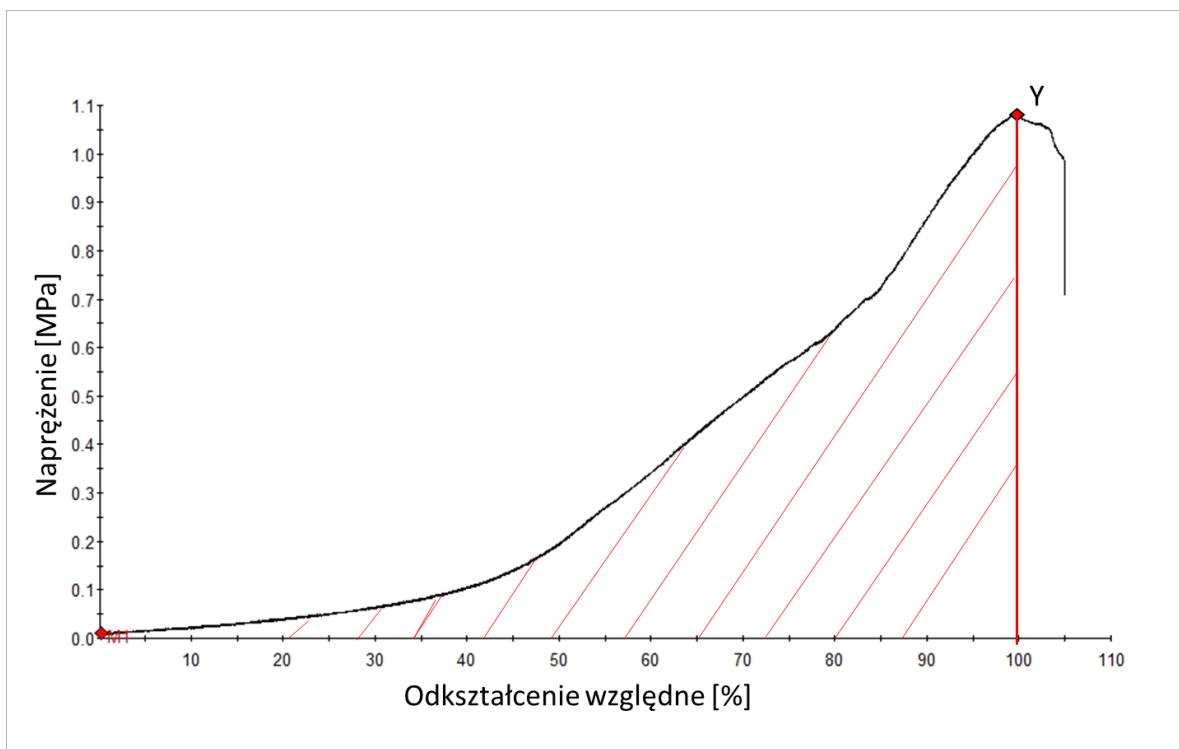
Przykładową krzywą naprężenie/ odkształcenie z zaznaczonym punktem Y zaprezentowano na Ryc. 3 – 11.



Ryc. 3-11 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym punktem Y, przy którym naprężenie odpowiadało największej sile rozciągającej próbkę.

3.13.7 Wyznaczanie energii w punkcie maksymalnego naprężenia

Parametrem, który dobrze opisuje właściwości mechaniczne materiałów jest energia zaabsorbowana przez daną objętość materiału. Energia wyznaczana w punkcie maksymalnego naprężenia (Y) działającego na próbkę opisuje stan tuż przed zerwaniem próbki i wyznaczona jest na podstawie pola powierzchni pod krzywą naprężenia do odkształcenia w punkcie maksymalnego naprężenia próbki. Energia ta wyrażana jest w $J \cdot m^{-2}$ (Ryc. 3 – 12).



Ryc. 3-12 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym polem powierzchni pod krzywą w punkcie Y, przy którym naprężenie odpowiadało największej sile rozciągającej próbkę.

3.13.8 Wyznaczanie wartości naprężenia w momencie zerwania próbki

Na podstawie wykonanej próby rozciągania wyznaczono również wartość naprężenia zrywającego. Wartość ta wyznaczana była przez program komputerowy w momencie zerwania próbki. Obliczano siłę działającą na próbkę w momencie jej zerwania (F), którą odnoszono do powierzchni przekroju próbki (A). Moment zerwania próbki określany był przez program komputerowy jako punkt, w którym siła spadła o 20% w stosunku do maksymalnej siły działającej na próbkę podczas testu.

3.14 Analiza statystyczna wyników

Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica® 13.1 (StatSoft, Polska). Dla każdego z badanych parametrów obliczono statystyki opisowe, które obejmowały wartości: średniej, odchylenia standardowego, medianę, wartość minimalną i maksymalną oraz kwartyła dolnego (Q25) i górnego (Q75). Dane otrzymane w poszczególnych grupach poddano ocenie normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka. Wartość funkcji testowych (W, d) oraz otrzymane prawdopodobieństwo wskazywały, iż w przypadku wszystkich analizowanych liczbowo parametrów rozkład danych przyjmował postać normalnego. Wykonano ponadto test Levene'a, który wskazał na homogeniczność przeważającej części badanych grup. Do oceny istotności różnic między grupami doświadczalnymi w badaniach biomechanicznych matryc tkankowych w poziomie analizowanych parametrów wykorzystano metodę analizy wariancji dla klasyfikacji pojedynczej i wieloczynnikowej (ANOVA/MANOVA). Do sprawdzenia istotności różnic pomiędzy grupami w obrębie typu decelularyzacji zastosowano test Tukey'a dla nierównych grup, przy poziomie istotności $p < 0,05$. Ocenę istotności różnic w obrębie komplementarnych grup pomiędzy typami decelularyzacji (D1 i D2) przeprowadzono z użyciem testu t-Studenta ($p < 0,05$).

Tab. 3-3 Skład roztworów użytych w eksperymentach.

L.p.	NAZWA ROZTWORU	SKŁAD	ILOŚĆ
1	Kąpiel antybiotykowa na bazie płynu Ringera	Izotoniczny roztwór Ringera	250 mL
		Penicylina 500 I.U. /mL	2,5 mL
		Streptomycyna 5000 µg/mL	2,5 mL
		Flukonazol	1 mL
		Ciprinol 10 mg/mL	0,25 mL
2	Kąpiel antybiotykowa na bazie zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) pozbawiony jonów wapnia i magnezu o pH 7.0	250 mL
		Penicylina 500 I.U. /mL	2,5 mL
		Streptomycyna 5000 µg/mL	2,5 mL
		Flukonazol	1 mL
		Ciprinol 10mg/mL	0,25 mL
3	Roztwór detergentów wykorzystany do decellularyzacji tkanek metodą D1	Izotoniczny roztwór Ringera	250 mL
		Dodecylosiarczan sodu (SDS)	1,25 g
4	Roztwór detergentów wykorzystany do decellularyzacji tkanek metodą D2	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) pozbawiony jonów wapnia i magnezu o pH 7.0	250 mL
		Triton X-100	12,5 mL
		Deoksycholan sodu	1,25 g
		Penicylina 500 I.U. / mL	2,5 mL
		Streptomycyna 5000 µg / mL	2,5 mL
		Flukonazol	1 mL
		Ciprinol 10mg/mL	0,25 mL
5	Mieszanina enzymów wykorzystana do decellularyzacji tkanek metodą D2	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) pozbawiony jonów wapnia i magnezu o pH 7.0 - 250 mL	250 mL
		DNAza	62,5 mg
		RNAza	25 mg
		Chlorek magnezu	5 g
		Penicylina 500 I.U. /mL	2,5 mL
		Streptomycyna 5000 µg/mL	2,5 mL
		Flukonazol	1 mL
		Ciprinol 10mg/mL	0,25 mL
6	0,05% roztwór aldehydu glutarowego (GA3)	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) pozbawiony jonów wapnia i magnezu o pH 7.0	499 mL
		25% roztwór aldehydu glutarowego	1 mL

Tab. 3-3 cd...

L.p.	NAZWA ROZTWORU	SKŁAD	ILOŚĆ
7	0,025% roztwór aldehydu glutarowego (GA2)	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) pozbawiony jonów wapnia i magnezu o pH 7.0	499,5 mL
		25% roztwór aldehydu glutarowego	0,5 mL
8	0,0125% roztwór aldehydu glutarowego (GA1)	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) pozbawiony jonów wapnia i magnezu o pH 7.0	499,75 mL
		Roztwór aldehydu glutarowego 25%	0,25 mL
9	Hematoksylina Verhoeff'a	Hematoksylina w etanolu absolutnym 5%	50 mL
		Chlorek żelaza (III) 10%	25 mL
		Płyn Lugola	25 mL
10	Pąs ksylidynowy	Pąs ksylidynowy	1 g
		Fuksyna kwaśna	1g
		1% kwasu octowego	100 mL
11	FDA	Aceton	1 mL
		Diocetan fluoresceiny	1 mg
12	PI	Woda destylowana	1 mL
		Jodek propidyny	1 mg
13	Roztwór kalcyfikujący	Wody destylowane	1000 mL
		Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,65 g
		NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,07 g
		CaCl ₂	0,28 g
		KCl	0,3 g
		NaCl	8,19 g
		NaN ₃	1g
		Albumina	5g
14	Roztwór kaolagenazy (II)	Medium 199	125 mL
		Kolagenaza II	10 U · mL ⁻¹
15	Medium do hodowli komórek śródbłónka	Medium EGM2	475 mL
		Penicylina 500 I.U. /mL	2,5 mL
		Streptomycyna 5000 µg/mL	2,5 mL
		Flukonazol	1 mL
		Ciprinol 10mg/mL	0,25 mL
		VEGF	50 ng
		EGF	50 ng
		FGF	50 ng
		IGF-1	75 ng
		L-glutamina	50 mM
		Siarczan heparyny	3,75 U
		Hydrokortyzon	50 µg
		Kwas askorbinowy	250 µg
		Surowica bydlęca	10 mL

Tab. 3-4 Wykaz odczynników stosowanych w eksperymentach.

Nazwa odczynnika	Firma
Aceton	POCH S.A., Polska
Albumina	Sigma-Aldrich, Niemcy
Alcian Blue pH 2,5 KIT	Bio-Optica, Włochy
Alizarin Red S	Merck Milipore, USA
Alkohol etylowy	POCH S.A., Polska
Alkohol etylowy absolutny	POCH S.A., Polska
Azydek sodu (NaN_3)	POCH S.A., Polska
Chlorek magnezu	POCH S.A., Polska
Chlorek potasu (KCl)	POCH S.A., Polska
Chlorek sodu (NaCl)	POCH S.A., Polska
Chlorek wapnia (CaCl_2)	POCH S.A., Polska
Chlorek żelaza (III)	POCH S.A., Polska
Ciprinol 10mg/mL	KRKA, Polska
DAPI	Sigma-Aldrich, Niemcy
Deoksycholan sodu	Sigma-Aldrich, Niemcy
DNAza	Sigma-Aldrich, Niemcy
DPX	Merck Milipore, USA
ELISA IL6	Fine Biotech Co., Ltd., Chiny
ELISA IL8	Biolegend, USA
Eozyna	Stamar, Polska
Falloidyna	Sigma-Aldrich, Niemcy
FDA	Sigma-Aldrich, Niemcy
Flukonazol	B. Braun, Niemcy
Formaldehyd	POCH S.A., Polska
Fuksyna kwaśna	POCH S.A., Polska
Hematoksylina 5%	Dako REAL, USA
Jod	POCH S.A., Polska
Jodek potasu	POCH S.A., Polska
Kolagenaza II	GIBCO, USA
Ksilen	POCH S.A., Polska
Kwas fosforomolibdenowy	POCH S.A., Polska

Tab. 3-4 cd...

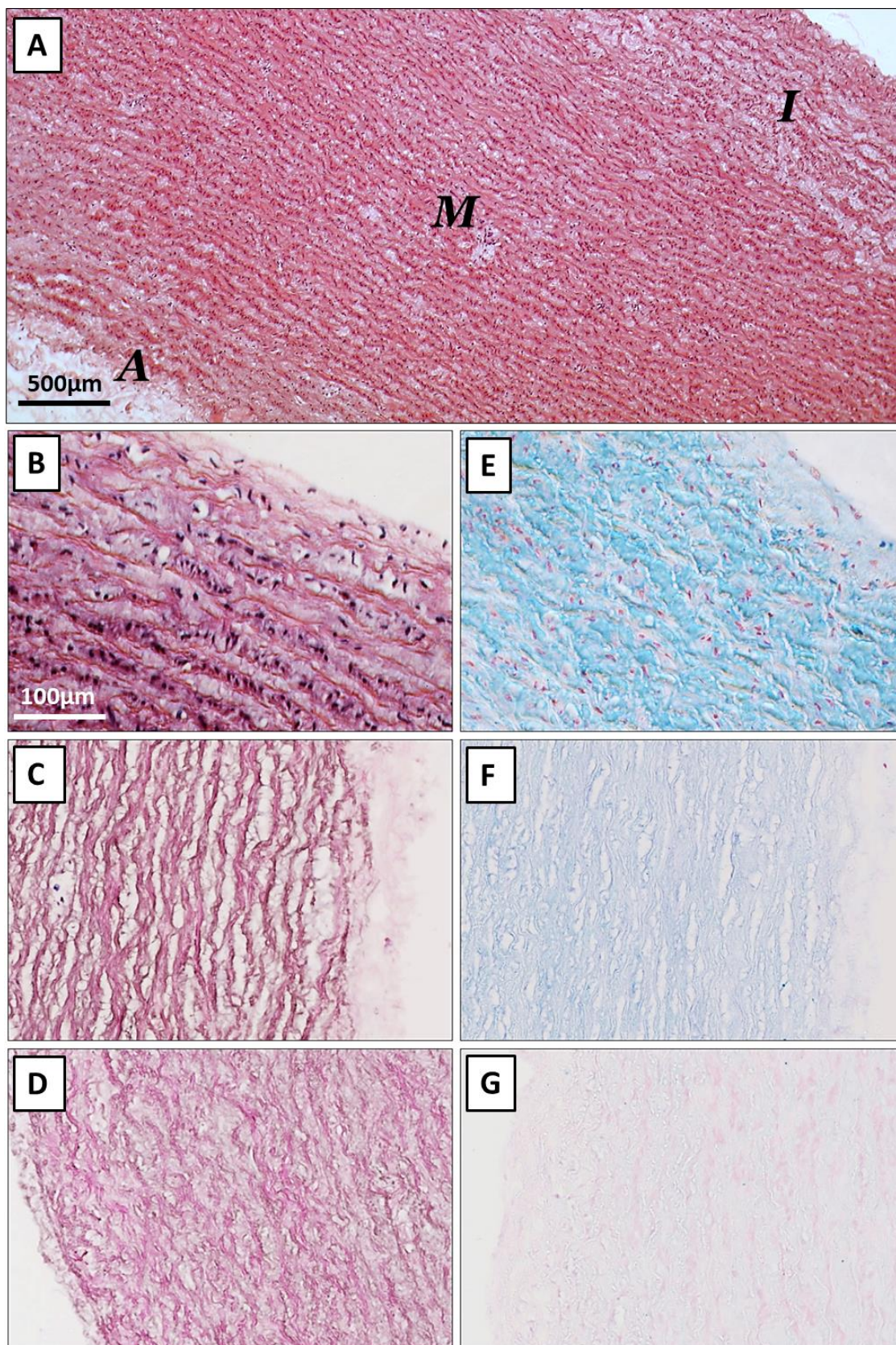
Nazwa odczynnika	Firma
Kwas octowy	POCH S.A., Polska
Linia komórek śródbłónka pozyskana z żyły pepowinowej	GIBCO C-003-5C, USA
Medium do hodowli komórek śródbłónka VBM (vascular cells basal medium)	ATCC, USA
Medium do hodowli komórek 199	Thermo Fisher, USA
Naczynia do hodowli komórek T75	Thermo Fisher, USA
Pąs ksylidynowy	Sigma-Aldrich, Niemcy
PBS	Sigma-Aldrich, Niemcy
Penicylina 500 I.U	Corning, USA
PI	Appli Chem, Niemcy
Probówki wirowe o objętości 50 mL	Corning Inc., USA
Przeciwciało przeciwko wimentynie koniugowane z fikoerytryną (PE)	Becton, Dickinson and Company, USA
RNAza	Sigma-Aldrich, Niemcy
Roztwór aldehydu glutarowego 25%	POCH S.A., Polska
Roztwór Ringera	B. Braun, Niemcy
Streptomycyna 5000 µg/mL	Corning, USA
Suplementy do medium do hodowli śródbłónka	ATCC, USA
Tiosiarczan sodu	Pharma Cosmetic, Polska
Trypsyna 1% z EDTA 0,05%	Sigma-Aldrich, Niemcy
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Niemcy
Wodorofosforan disodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$)	POCH S.A., Polska
Wodorofosforan sodu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	POCH S.A., Polska
Zieleń świetlista (Light Green SF Yellowish)	Sigma-Aldrich, Niemcy

4 WYNIKI

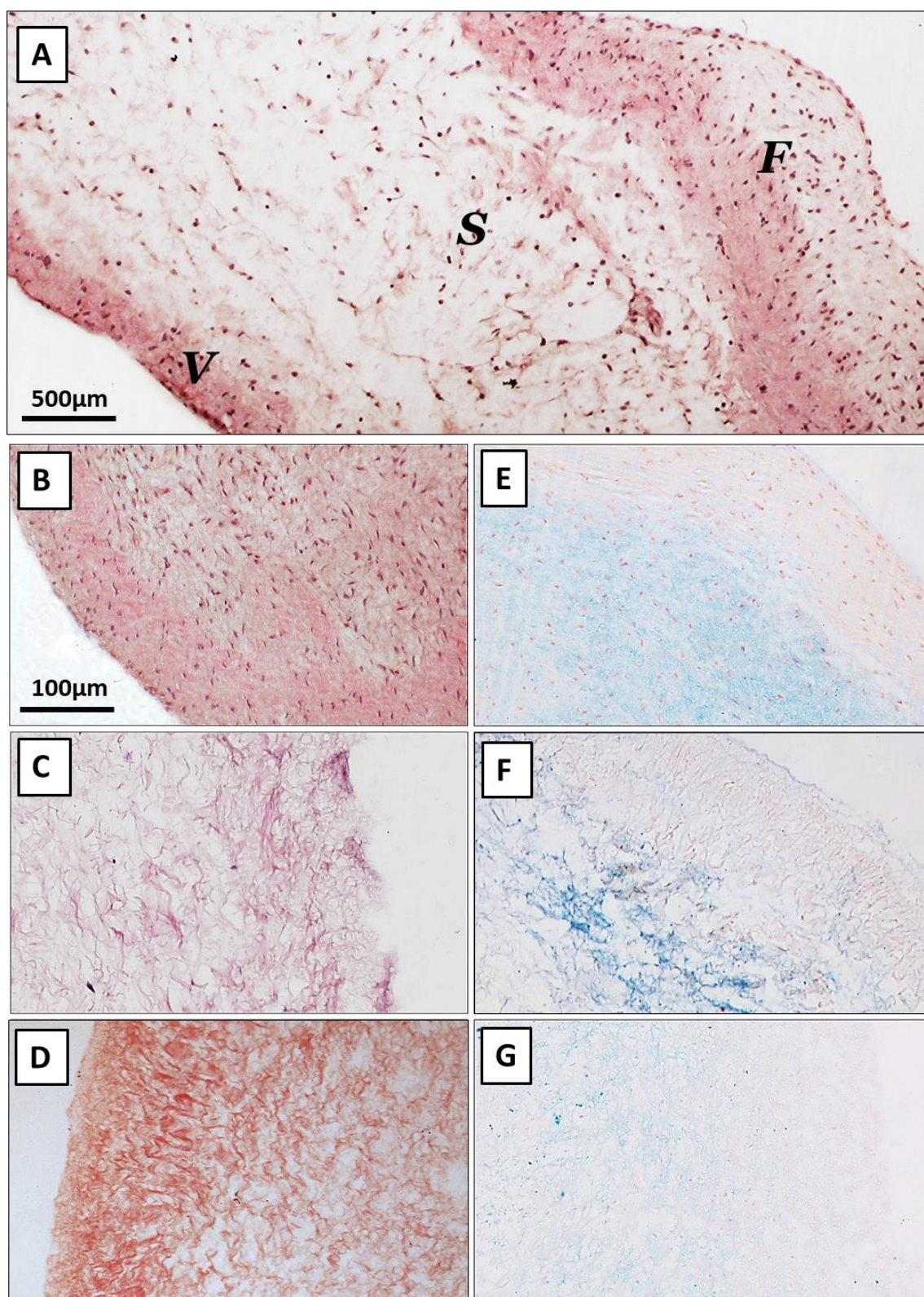
4.1 Wpływ procesu decelularyzacji na wybrane właściwości morfologiczne bezkomórkowych matryc zastawki płucnej

4.1.1 Ocena efektywności procesu decelularyzacji oraz jego wpływ na strukturę włókien białek macierzy zewnątrzkomórkowej badanych tkanek

Analiza obrazów mikroskopowych tkanek naczyń barwionych HE (Ryc. 4 – 1, A – D) wykazała typową morfologię, która charakteryzowała się trójwarstwową strukturą składającą się z błony wewnętrznej, błony środkowej i błony zewnętrznej (Ryc. 4 – 1, A). Z porównywania efektywności stosowanych metod decelularyzacji: D1 (enzymatyczna) (Ryc. 4 – 1; C) oraz D2 (detergentowa) (Ryc. 4 – 1; D) wynika, że w preparatach z grupy D1n występowało od 3 do 14 (średnio 5) jąder komórkowych w polu widzenia, natomiast w przypadku grupy D2n liczba ta nie przekraczała 3 jąder w polu widzenia. Zaobserwowano także, iż struktura włókien ECM, w przypadku zastosowania detergentowej metody decelularyzacji (grupa D2n), była bardziej zwarta niż po zastosowaniu enzymatycznej metody usuwania komórek (grupa D1n). W miejscach, w których obecne były komórki po decelularyzacji powstały wyraźne przestrzenie między włóknami ECM. Barwienie ALB, obrazujące zawartość GAG w tkance, wykazało różnice między zastosowanymi metodami decelularyzacji dotyczące stopnia usunięcia GAG z tkanki (Ryc. 4 – 1; E – G). Metoda D1 miała mniejszy wpływ na obecność GAG w tkance naczyń, w porównaniu do metody D2. Przykładowy obraz mikroskopowy preparatów D1n (Ryc. 4 – 1; F) przedstawia zmniejszenie zawartości GAG, którą oszacowano w skali 0 – 3 jako stopień 1. Tkanki poddane decelularyzacji z zastosowaniem metody D2 charakteryzowały się bardzo niską zawartością lub brakiem GAG (stopień 0) (Ryc. 4 – 1; G). Preparaty płatków zastawek serca (Ryc. 4 – 2) charakteryzowały się typową budową zrębu łącznotkankowego składającego się ze środkowej warstwy gąbczastej oraz zewnętrznych warstw: włóknistej oraz przykomorowej (Ryc. 4 – 2; A). W preparatach płatków zastawek z grupy D1p (Ryc. 4 – 2; C) wybarwionych HE obserwowano do 3 jąder komórkowych w polu widzenia, podczas gdy w próbach z grupy D2p (Ryc. 4 – 2; D) nie wykazano obecności komórek. Zmiany wystąpiły także w strukturze tkanki po procesie decelularyzacji.



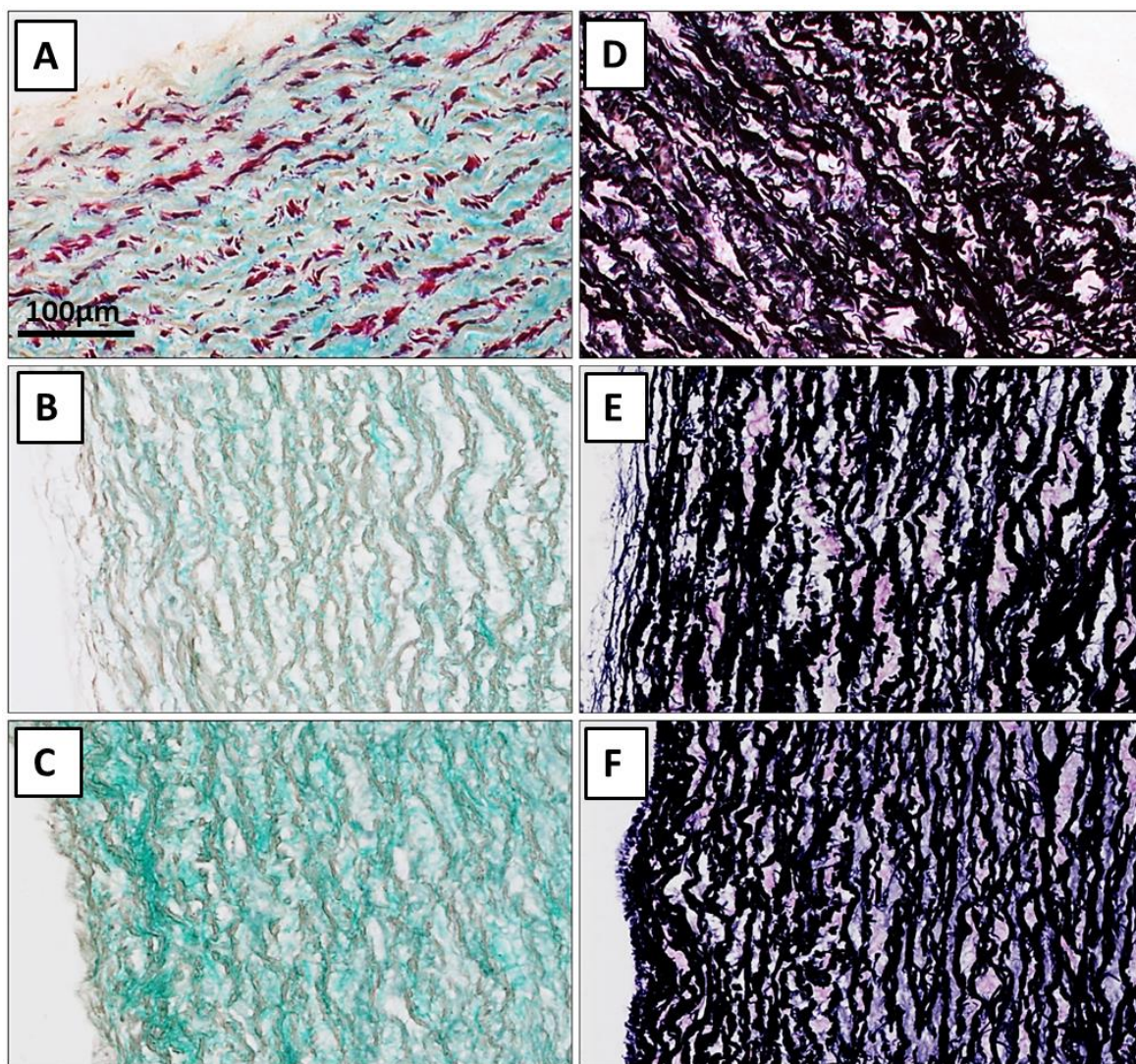
Ryc. 4-1 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych naczyń zastawki płucnej (n) wybarwione hematoksyliną i eozyną – A, B, C,D oraz błękitem alcjanowym – E, F, G. Na obrazie A – zaznaczono warstwową budowę naczynia *I* – *intima*; *M* – *media*; *A* – *adventita*. Kolejne litery alfabetu oznaczają A, B, E – tkanki natywne (Nn); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1n); D, G – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2n); (N=6).



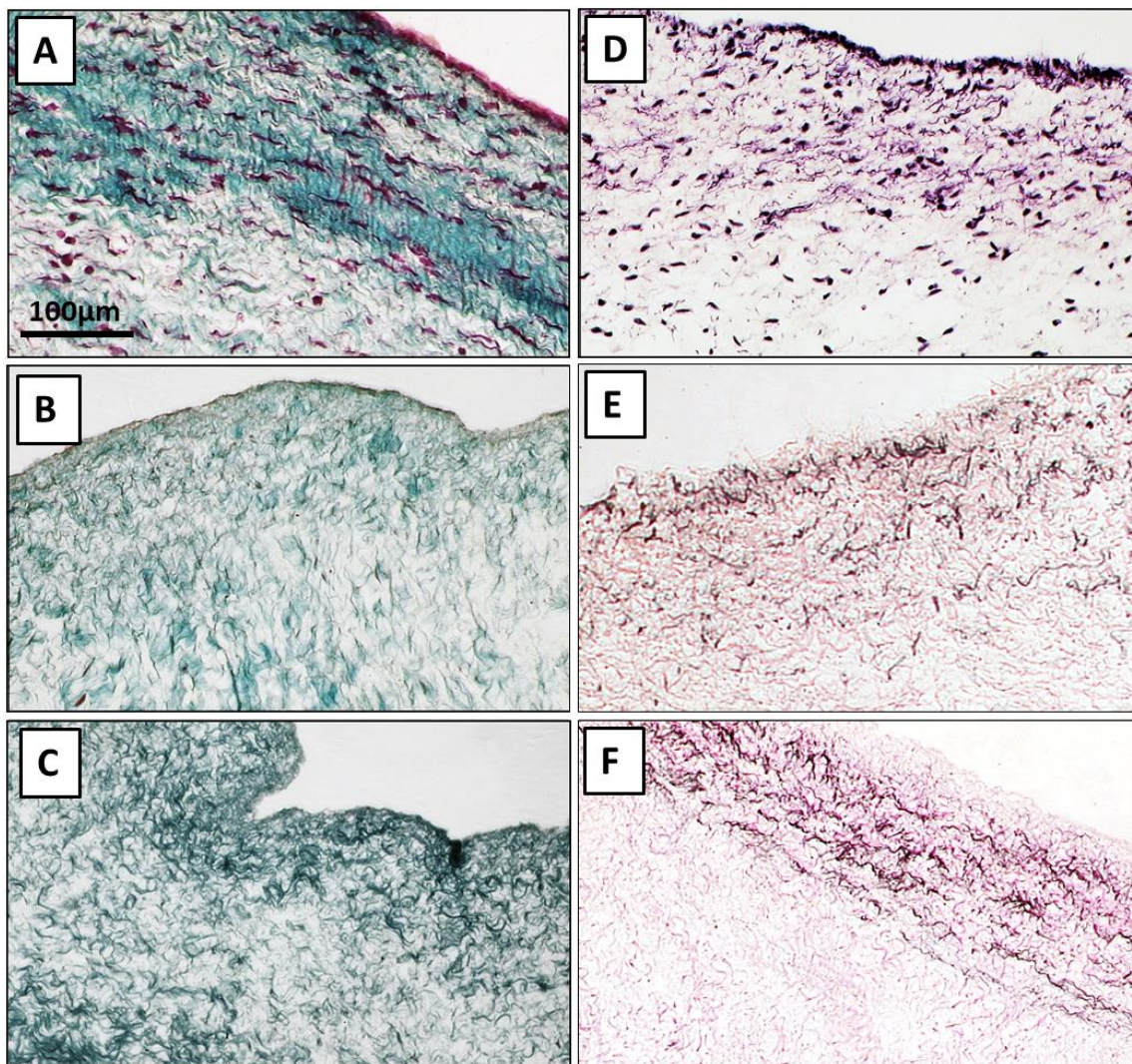
Ryc. 4-2 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych płatków (p) zastawki płucnej wybarwione hematoksyliną i eozyną – A, B, C,D oraz błękitem alcjanowym – E, F, G. Na obrazie A – zaznaczono warstwową budowę naczyń *F* – fibrosa; *S* – *spongiosa*; *V* – *ventricularis*. Kolejne litery alfabetu oznaczają A, B, E – tkanki natywne (Np); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1p); D, G – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2p); (N=6).

Płatki po decelularyzacji metodą enzymatyczną (grupa D1p) (ryc. 4 – 2; C) charakteryzowały się luźniejszą strukturą niż po zastosowaniu metody detergentowej (D2p) (Ryc. 4 – 2; D). Jednak metoda D2, tak jak było to w przypadku naczyń, istotnie zmniejszyła zawartość GAG w płatkach zastawki, co pozwoliło zaklasyfikować ich obecność jako stopień 0 (Ryc. 4 – 2; G). Z kolei płatki po decelularyzacji metodą D1 charakteryzowały się zawartością GAG na poziomie 1 (Ryc. 4 – 2; F).

Barwienie metodą Massona wykazało mniejszą barwliwość naczyń i płatków modyfikowanych metodą D1 (Ryc. 4 – 3 i 4 – 4; B) w stosunku do tkanki natywnej (Ryc. 4 – 3 i 4 – 4; A) oraz tkanek po decelularyzacji metodą D2 (Ryc. 4 – 3 i 4 – 4; C). Preparaty po decelularyzacji detergentowej (grupa D2n i D2p) wykazywały zwartą strukturę oraz morfologię zbliżoną do tkanek natywnych, których intensywność zabarwienia oceniono jako stopień 2. Tkanki z grupy D1n i D1p charakteryzowały się natomiast zanikiem barwliwości i rozwarstwieniem włókien. Intensywność zabarwienia preparatów naczyń i płatków po enzymatycznej decelularyzacji (grupa D1n i D1p) oceniono jako stopień 1. Na preparatach naczyń wybarwionych VEG, w celu zobrazowania włókien elastynowych, zaobserwowano, iż obie metody decelularyzacji: D1 i D2 nie zmieniają istotnie zawartości wymienionych włókien w tkance (Ryc. 4 – 3; E i F). Zauważono natomiast, iż w przypadku tkanki natywnej włókna elastynowe mają strukturę bardziej pofałdowaną niż w przypadku tkanek decelularnych (Ryc. 4 – 3; D). Podobnie jak to zaobserwowano na preparatach barwionych HE i metodą Massona, pojawiły się większe przestrzenie między włóknami ECM po zastosowaniu enzymatycznej metody decelularyzacji (grupa D1n), w porównaniu do decelularyzacji detergentowej (grupa D2n). Preparaty naczyń zastawek serca z grupy D1n charakteryzowały się wysoką barwliwością ocenioną jako stopień 2, natomiast z grupy D2n wysoką barwliwością o zwartej strukturze, który oceniono jako stopień 3. Podobną tendencję zaobserwowano w preparatach płatków zastawek serca (Ryc. 4 – 4), gdzie po decelularyzacji enzymatycznej (grupa D1p) odnotowano większe rozluźnienie w strukturze włókien niż w grupie D2p. Płatki po decelularyzacji detergentowej (grupa D2p) (Ryc. 4 – 4; F) miały także bardziej zbliżoną budowę do tkanki natywnej niż po zastosowaniu decelularyzacji enzymatycznej (grupa D1p) (Ryc. 4 – 4; E).



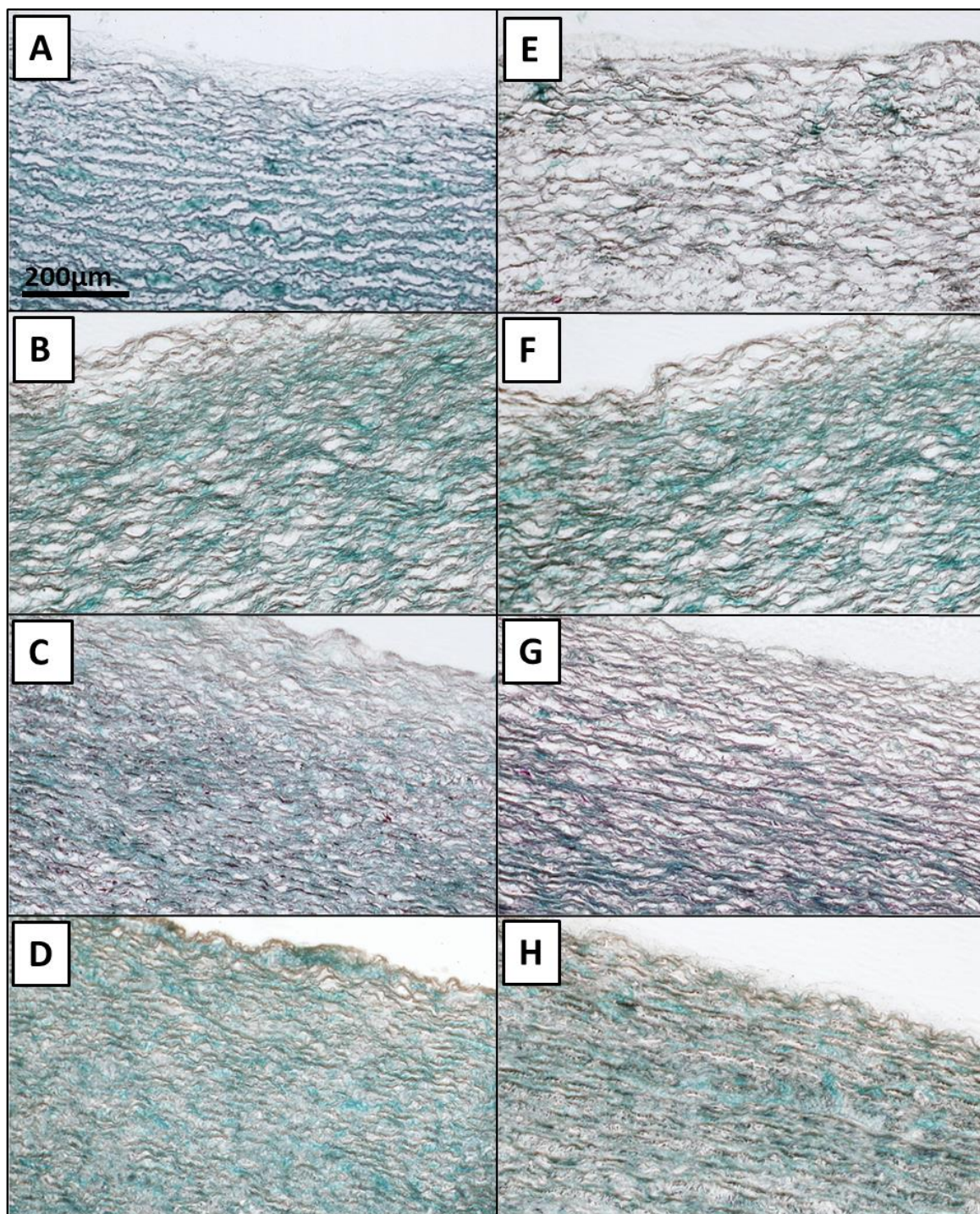
Ryc. 4-3 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych naczyń (n) zastawki płucnej wybarwione metodą Masson'a – A, B, C oraz metodą VEG – D, E, F. Kolejne litery alfabetu oznaczają: A, D – tkanki natywne (Nn); B, E – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1n); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2n); (N=6).



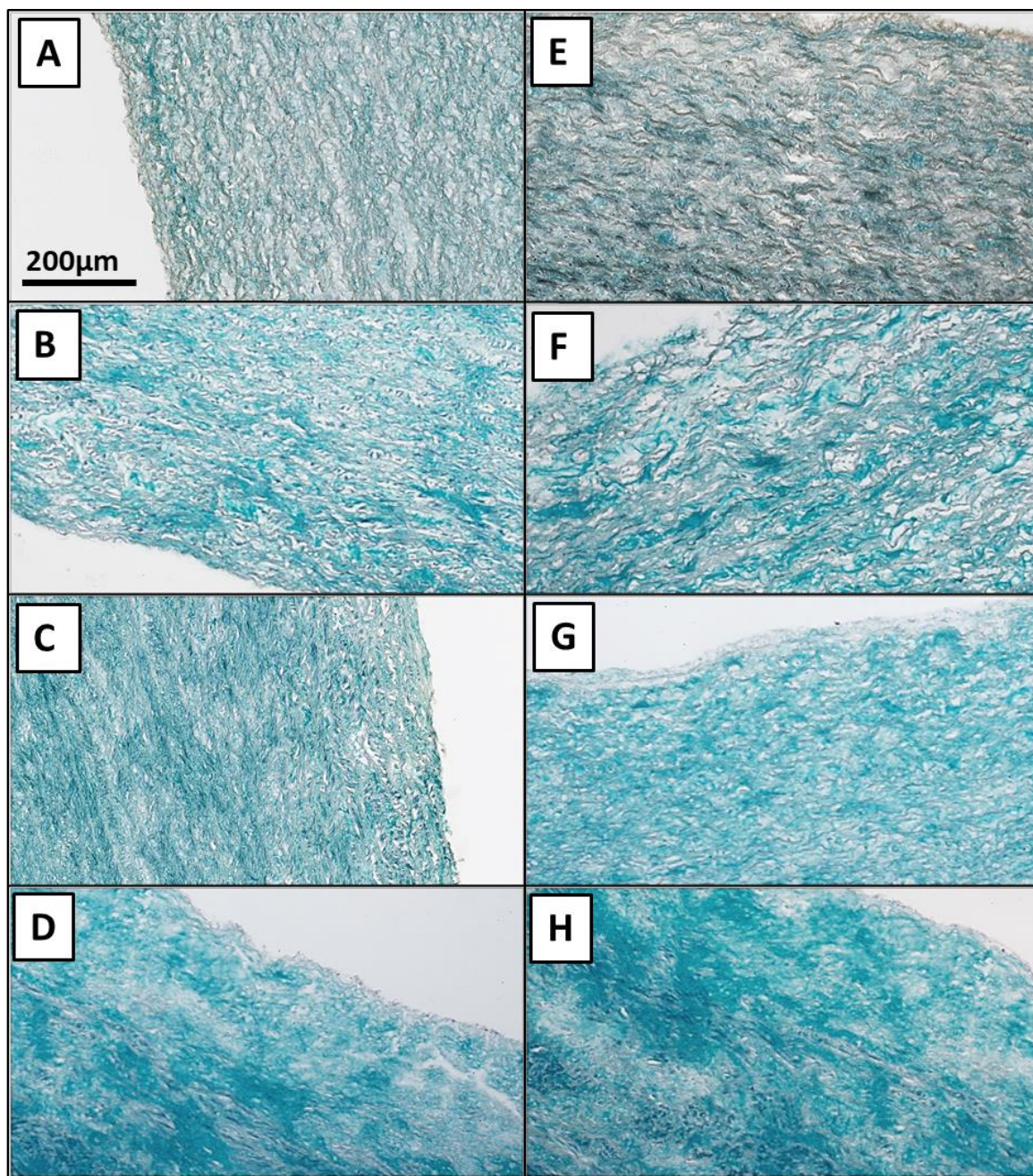
Ryc. 4-4 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych płatków (p) zastawki płucnej wybarwione metodą Masson'a – A, B, C oraz metodą VEG – D, E, F. Kolejne litery alfabetu oznaczają: A, D – tkanki natywne (Np); B, E – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1p); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2p); (N=6).

4.2 Ocena wpływu sieciowania tkanek z użyciem aldehydu glutarowego na stopień degradacji enzymatycznej z zastosowaniem kolagenazy II

Wpływ degradacji enzymatycznej na tkanki decelularne i traktowane GA zbadano przy użyciu kolagenazy II. Naczynia poddane decelularyzacji metodą D1 po inkubacji z enzymem charakteryzowały się wyraźnym zmniejszeniem zawartości kolagenu (Ryc. 4 – 5; A, E) z wartości 1 do 0 (w skali czterostopniowej). W przypadku matryc z grupy D1n modyfikowanych GA1 (Ryc. 4 – 5; B, F), GA2 (Ryc. 4 – 5; C, G) oraz GA3 (Ryc. 4 – 5; D, H) zaobserwowano zwiększoną odporność na trawienie enzymem w stosunku do matrycy niesieciowanej. Zabarczenie tych tkanek przed i po trawieniu kolagenazą II nie różniło się od siebie co oceniono następująco: D1nGA1 (B i F) – stopień 1, D1nGA2 (C i G) – stopień 1, D1nGA3 (D i H) – stopień 2. Wykazano ponadto, że wraz ze zwiększającym się stężeniem GA tkanki odznaczały się bardziej zwartą strukturą, w porównaniu do matrycy niemodyfikowanej. Na Ryc. 4 – 6 zaprezentowano tkanki modyfikowane metodą D2. Wszystkie cechowało intensywne zabarwienie włókien kolagenowych, które w trójstopniowej skali oceniono następująco: D2n oraz D2nGA1 przed i po trawieniu kolagenazą II – stopień 2 (Ryc. 4 – 6; A, B, i E, F), natomiast D2nGA2 i D2nGA3 – stopień 3 (Ryc. 4 – 6; C, G, i D, H). Trawienie kolagenazą II nieznacznie wpłynęło na rozluźnienie struktury matrycy decelularnej D2n i D2nGA1, co zobrazowano na zdjęciu A i E oraz B i F (Ryc. 4 -6), nie stwierdzono jednak wpływu na ich zabarwienie. Podobnie jak w przypadku tkanek poddanych decelularyzacji metodą D1 stopień upakowania włókien w tkance wzrastał wraz ze zwiększającym się stężeniem GA. Zanotowano również, iż tkanki poddane decelularyzacji detergentowej (D2n) miały intensywniejsze zabarwienie, w porównaniu do tkanek z grupy D1n.

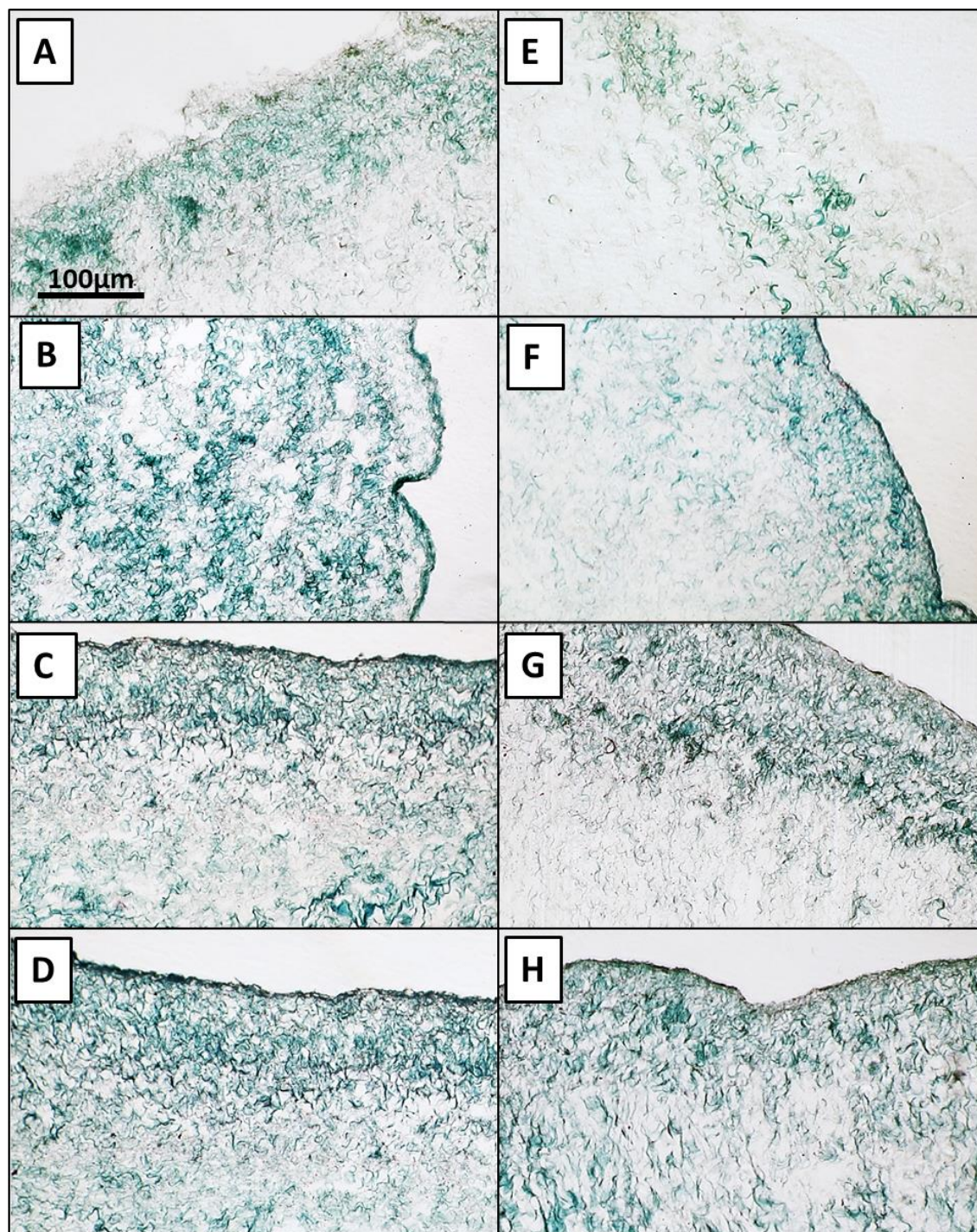


Ryc. 4-5 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych naczyń (D1n) zastawki płucnej przygotowanych metodą D1 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji metodą D1; B, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA1; C, G – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA2; D, H – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA3 (N=6).



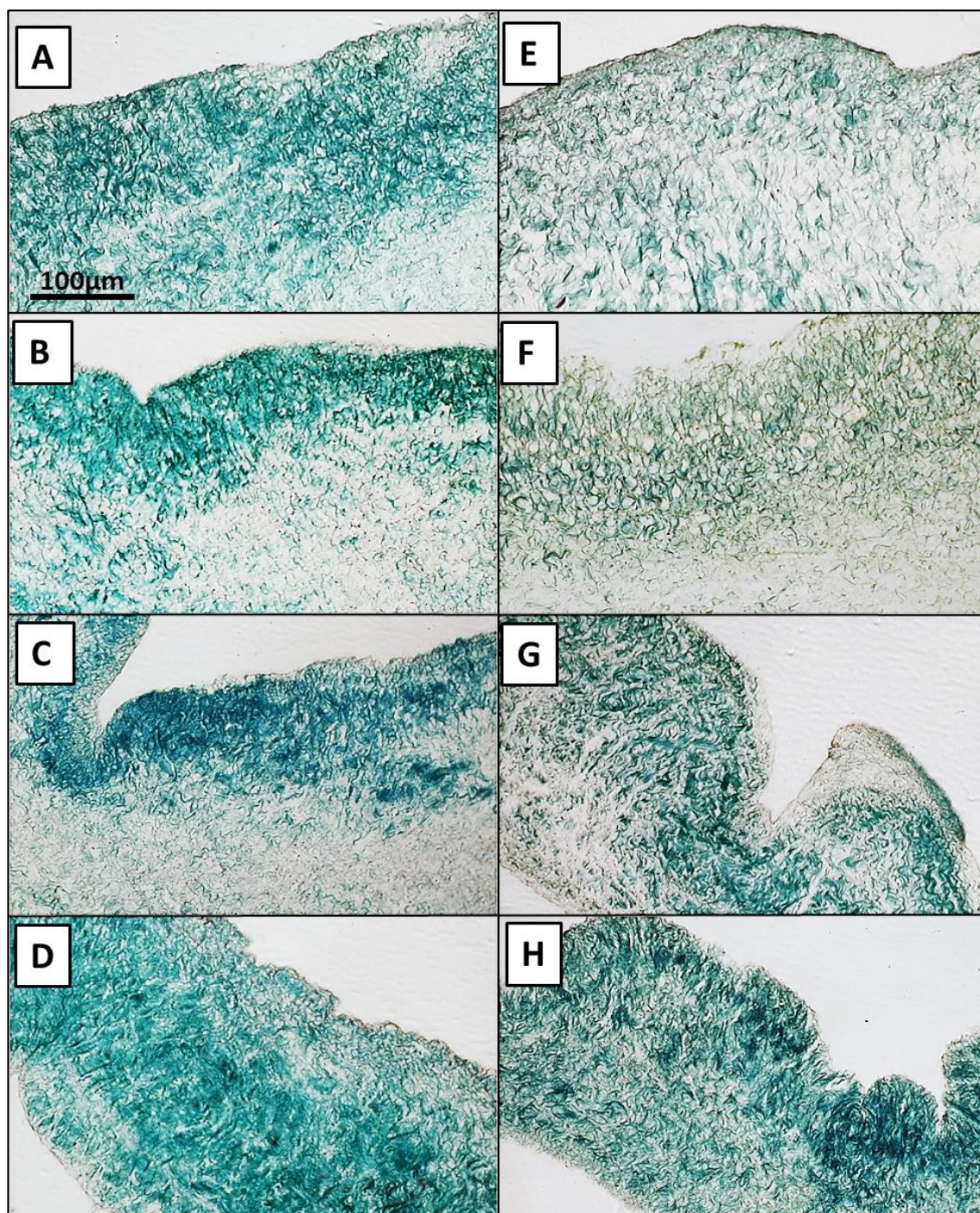
Ryc. 4-6 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych naczyń (D2n) zastawki płucnej przygotowanych metodą D2 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji metodą D2; B, F – matryce po decelularyzacji metodą D2 sieciowane GA1; C, G – matryce po decelularyzacji metodą D2 sieciowane GA2; D, H – matryce po decelularyzacji metodą D2 sieciowane GA3 (N=6).

W preparatach płatków zastawek wykazano zmniejszenie barwliwości włókien kolagenowych po trawieniu enzymatycznym ze stopnia 1 do poziomu 0 dla tkanek po decelularyzacji metodą D1 (grupa D1p) oraz z poziomu 3 do 1 dla płatków po



Ryc. 4-7 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych płatków (D1p) zastawki płucnej przygotowanych metodą D1 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji metodą D1; B, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA1, C, G – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA2, D, H – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA3 (N=6).

decelularyzacji metodą D2 (Grupa D2p) (Ryc 4 – 7 i 4 – 8; A, E). Różnice zanotowano także dla decelularnych płatków modyfikowanych GA1, które przejawiały mniejszą barwliwość po inkubacji z kolagenazą II. Zanotowano mniejszą barwliwość włókien w grupie D1pGA1 (obniżenie z poziomu 2 do 1) oraz w grupie D2pGA1 (obniżenie z poziomu 3 do 2) (Ryc. 4 –



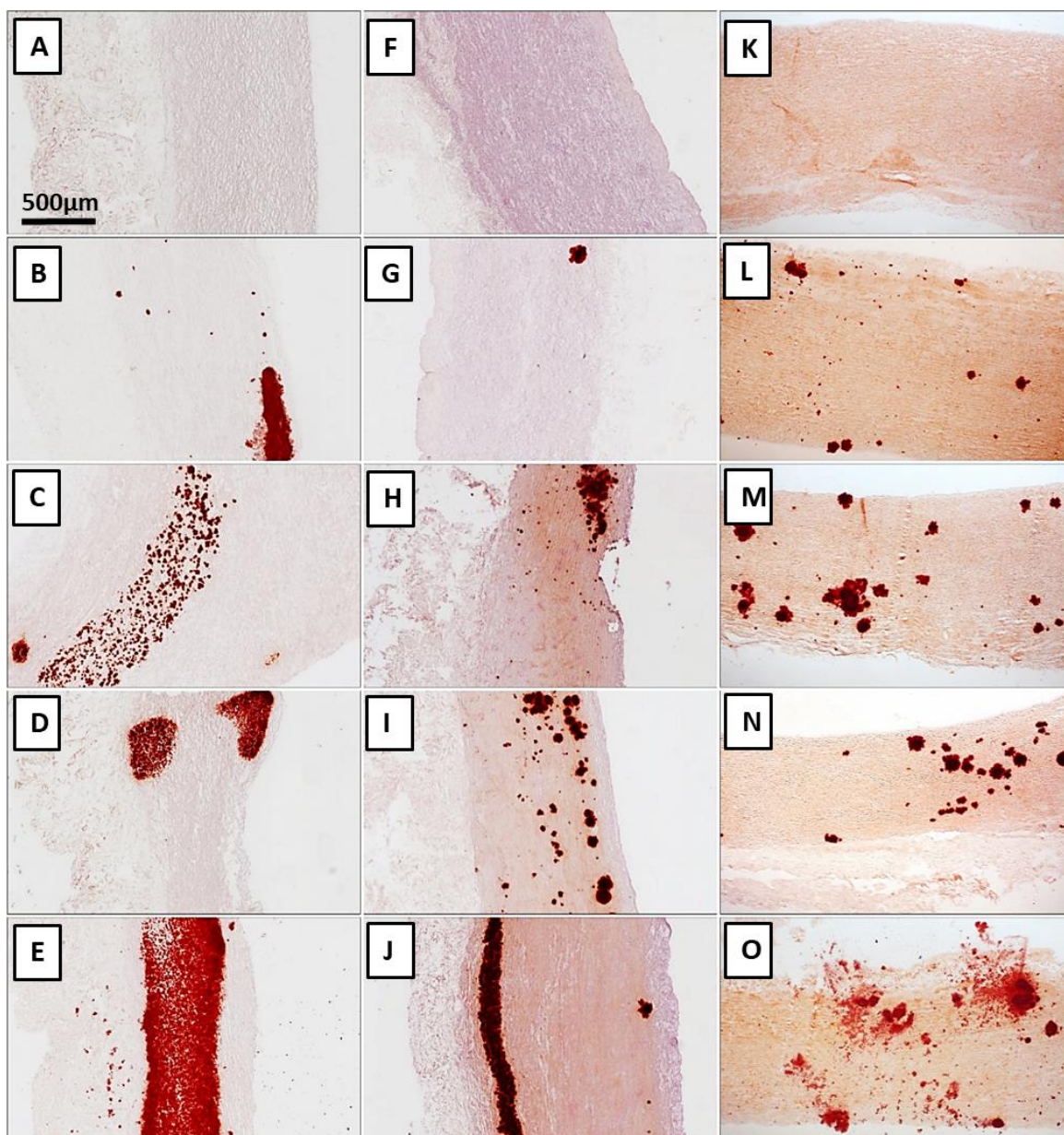
Ryc. 4-8 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych płatków (D2p) zastawki płucnej przygotowanych metodą D2 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji D2; B, F – matryce po decelularyzacji D2 sieciowane GA1, C, G – matryce po decelularyzacji D2 sieciowane GA2; D, H – matryce po decelularyzacji D2 sieciowane GA3 (N=6).

7 oraz 4 – 8; B, F). Tkanki modyfikowane stężeniami GA2 i GA3 nie wykazywały wyraźnych zmian w zabarwieniu po trawieniu enzymatycznym, a stopień ich zabarwienia oszacowano na stopień 2 dla tkanek po decelularyzacji enzymatycznej (grupa D1p) (Ryc. 4 – 7; C, D, G, H) oraz 3 dla matrycy z grupy D2p (Ryc. 4 – 8; C, D, G, H). Podobnie jak w przypadku naczyń D1n i D2n sieciowanych aldehydem glutarowym, modyfikacja GA wpłynęła na stopień upakowania włókien w strukturze płatków co widoczne jest zwłaszcza w przypadku matrycy traktowanych GA3 z grupy D2p (Ryc. 4 – 8; D, H).

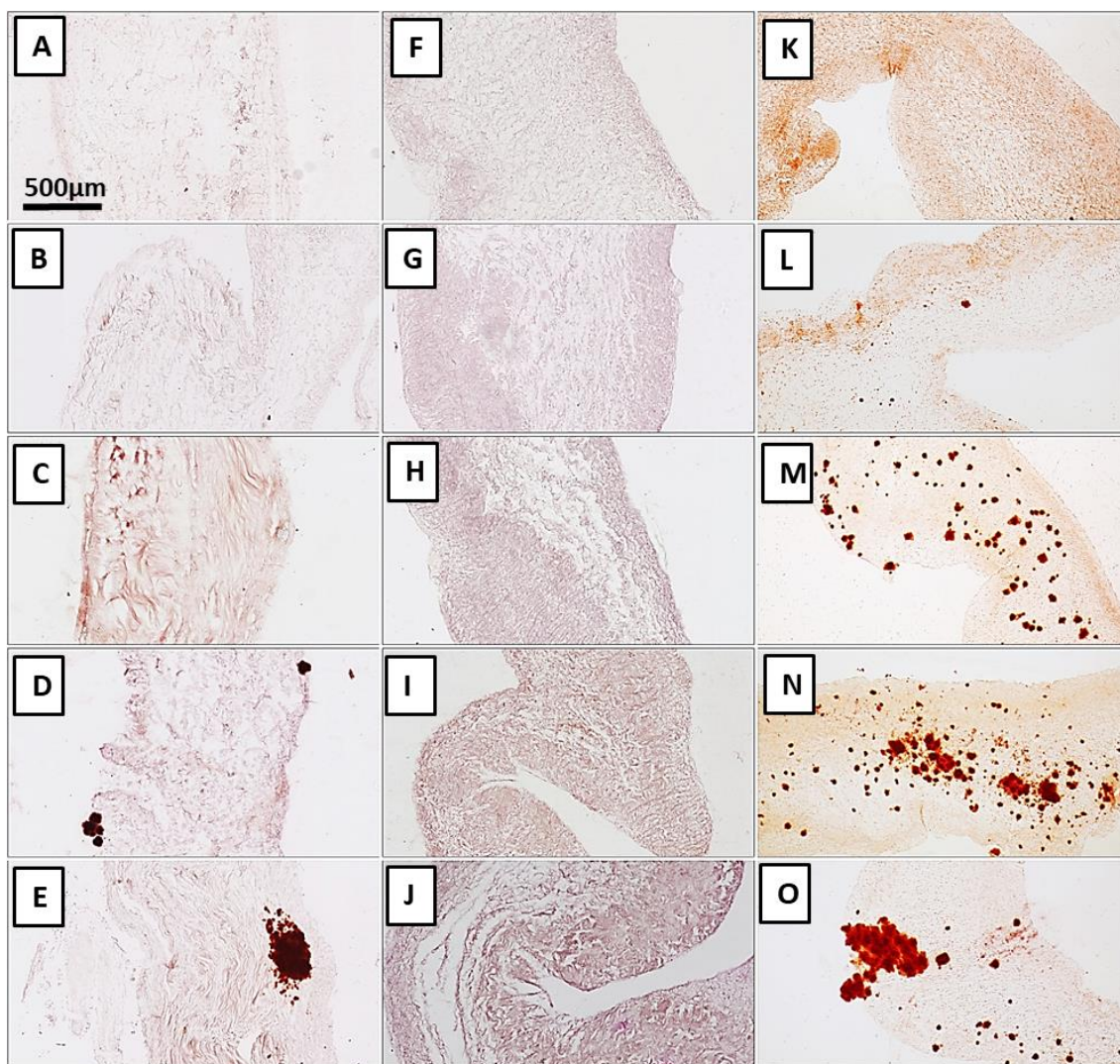
4.3 Kalcyfikacja

Badanie wpływu metody modyfikacji tkanek na stopień ich zwapnienia w warunkach *in vitro* wykazało, że wszystkie fragmenty badanych naczyń, po inkubacji w roztworze symulującym skład jonowy krwi, posiadały ogniska wapnia w swojej strukturze. Na Ryc. 4 – 9 zaprezentowano przykładowe obrazy preparatów naczyń zastawek serca z grupy D1n (A – E) i D2n (F – J) oraz tkanek natywnych Nn (K – O) sieciowanych za pomocą aldehydu glutarowego. Na zdjęciach A, F, K (Ryc. 4 – 9) pokazano obrazy tkanek przed eksperymentem, na których uwidoczniono brak zmian w postaci zwapnienia. Po 21 dniach eksperymentu preparaty matrycy po decelularyzacji enzymatycznej (D1) dla poszczególnych grup zostały ocenione według skali od 0 do 3 następująco: D1n (Ryc. 4 – 9; B) – 2, D1nGA1 (Ryc. 4 – 9; C) – 3, D1nGA2 (Ryc. 4 – 9; D) – 3, D1nGA3 (Ryc. 4 – 9; E) – 3. Niższy stopień zwapnienia wykazywały preparaty tkanek po decelularyzacji detergentowej (D2), gdzie stopień zwapnienia dla decelularnego rusztowania D2n (Ryc. 4 – 9; G) oceniony został jako 1, a matryce modyfikowane GA kolejno D2nGA1 (Ryc. 4 – 9; H) – 2, D2nGA2 (Ryc. 4 – 9; I) – 2, D2nGA3 (Ryc. 4 – 9; J) – 3. W przypadku tkanek natywnych złogi wapnia oceniona jako stopień 2 niezależnie od użytego stężenia GA (Ryc. 4 – 9; L, M, N, O).

Preparaty płatków (Ryc. 4 – 10) wykazywały inną zależność niż naczynia, tu złogi wapnia dla matrycy decelularnej D1p (Ryc. 4 – 10; B), modyfikowanej GA1 (Ryc. 4 – 10; C) oraz GA2 (Ryc. 4 – 10; D) oceniono jako stopień 1, natomiast najwyższe badane stężenie aldehydu glutarowego (GA1) (Ryc. 4 – 10; E) jako stopień 2. Co ciekawe matryce płatków poddane decelularyzacji detergentowej (grupa D2p) nie wykazywały śladów zwapnienia (Ryc. 4 – 10; G – J). Wśród tkanek natywnych tylko niemodyfikowane płatki oceniono jako stopień 1 (Ryc. 4 – 10; L) natomiast reszta preparatów wykazywała obecność wapnia na poziomie 2 (Ryc. 4 – 10; M, N, O).



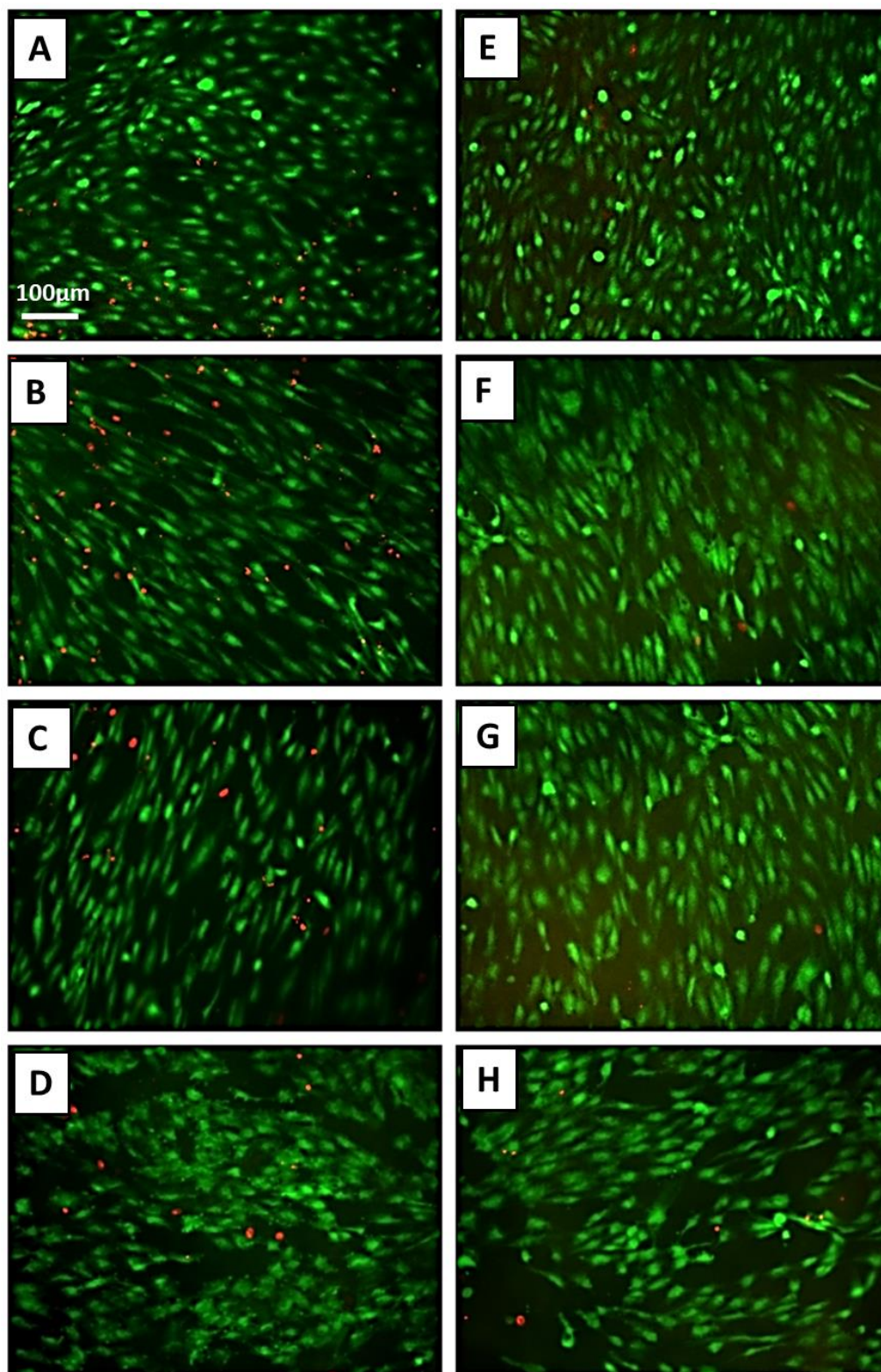
Ryc. 4-9 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych naczyń (D1n i D2n) oraz tkanek natywnych (Nn) zastawki płucnej wybarwione czerwienią alizarynową S. Obrazy A – E matryce po D1; F – J matryce po D2; K – O tkanki natywne. B, G, L – niesieciowane GA; C, H, M – sieciowane GA1; D, I, N – sieciowane GA2; E, J, O – sieciowane GA3. A, F, K – tkanki przed kalcyfikacją; B – E; G – J; L–O – tkanki po kalcyfikacji (N=6).



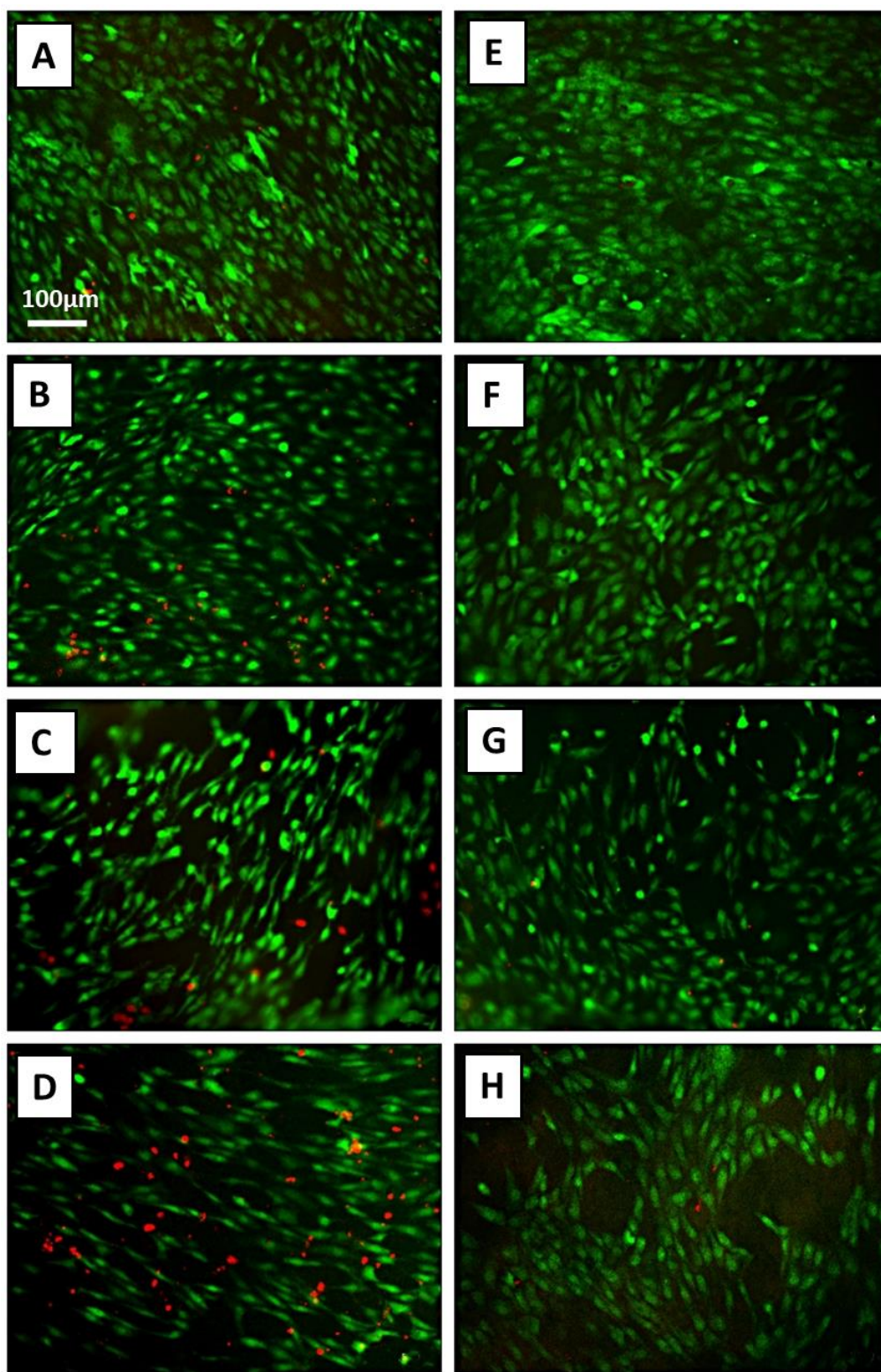
Ryc. 4-10 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych płatków (D1p i D2p) oraz tkanek natywnych zastawki płucnej (Np) wybarwione czerwienią alizarynową S. Obrazy A – E matryce po D1; F – J matryce po D2; K – O tkanki natywne. B, G, L – niesieciowane GA; C, H, M – sieciowane GA1; D, I, N – sieciowane GA2; E, J, O – sieciowane GA3. A, F, K – tkanki przed kalcyfikacją; B – E; G – J; L–O – tkanki po kalcyfikacji (N=6).

4.4 Ocena cytotoksyczności czynników stosowanych do modyfikacji decelularnych tkanek w stosunku do komórek śródbłónka.

W celu sprawdzenia cytotoksyczności decelularnych matryc sieciowanych niskimi stężeniami GA wykonano próbę ich zasiedlenia ludzkimi komórkami endotelialnymi (HUVEC). Na Ryc. 4 – 11 i 4 – 12; A – H zaprezentowano przykładowe obrazy uzyskane z mikroskopu fluorescencyjnego decelularnych naczyń i płatków zastawek zasiedlanych wymienionymi komórkami. Po 24 godzinach hodowli komórek na wszystkich rusztowaniach wykazano obecność żywych, adherentnych do powierzchni matrycy komórek. Zaobserwowano, iż żywe komórki posiadały charakterystyczny dla komórek endotelialnych kształt i układały się w sposób równoległy do siebie na wzór przypominający ułożoną kostkę brukową. Liczba komórek nekrotycznych była zależna od zastosowanej metody decelularyzacji oraz stężenia czynnika sieciującego w postaci GA (Ryc. 4 – 11 i 4 – 12). W przypadku matryc uzyskanych dzięki decelularyzacji z wykorzystaniem trypsyny (grupa D1n i D1p) w obrębie modyfikacji GA2 i GA3, zarówno dla naczyń jak i płatków, wykazano zmiany w morfologii komórek, przejawiające cechy defragmentacji.

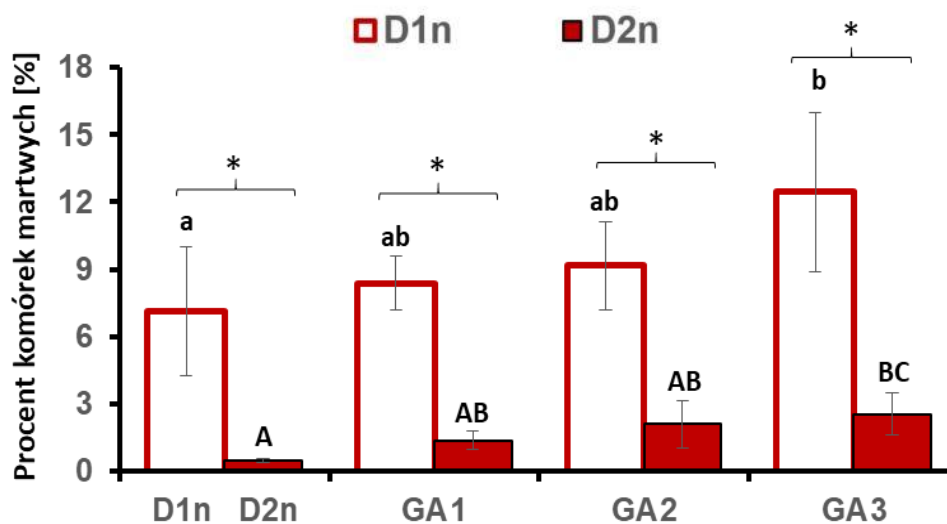


Ryc. 4-11 Przykładowe zdjęcia decelularnych naczyń (n) zastawki płucnej zasiedlone wtórnie komórkami śródbłonna. A – D tkanki poddane decelularyzacji metodą D1 (D1n); E – H tkanki poddane decelularyzacji metodą D2 (D2n). Kolejne litery oznaczają: A – kontrola D1n; E – kontrola D2n; B – D1n sieciowane GA1; F – D2n sieciowane GA1; C – D1n sieciowane GA2; G – D2n sieciowane GA2; D – D1n sieciowane GA3; H – D2n sieciowane GA3. Komórki żywe zabarwione na kolor zielony, martwe – czerwony, (N=6).



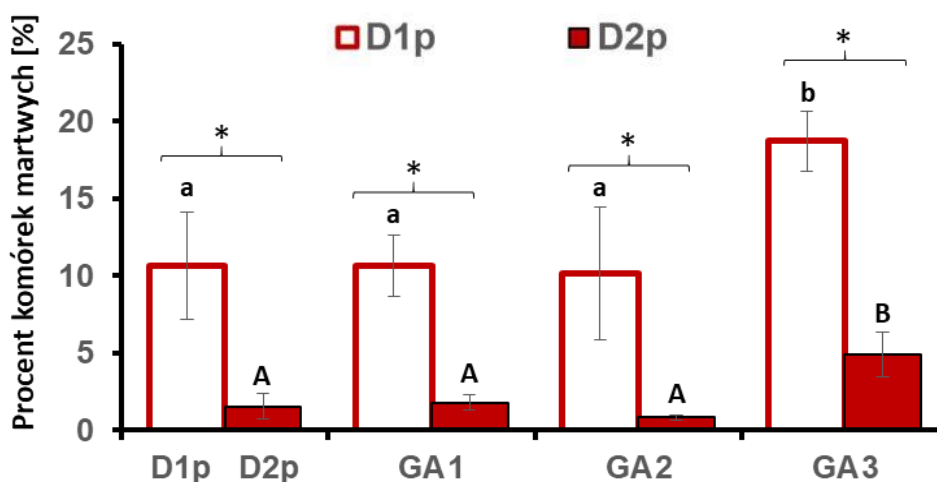
Ryc. 4-12 Przykładowe zdjęcia decelularnych płatek (p) zastawki płucnej zasiedlone wtórnie komórkami śródbłonna. A – D tkanki poddane decelularyzacji metodą D1 (D1p); E – H tkanki poddane decelularyzacji metodą D2 (D2p). Kolejne litery oznaczają: A – kontrola D1p; E – kontrola D2p; B – D1p sieciowane GA1; F – D2p sieciowane GA1; C – D1p sieciowane GA2; G – D2p sieciowane GA2; D – D1p sieciowane GA3; H – D2p sieciowane GA3. Komórki żywe zabarwione na kolor zielony, martwe – czerwony, (N=6).

Dla każdej z matryc w oparciu o obraz mikroskopowy obliczono liczbę wszystkich komórek, a następnie obliczono procent komórek martwych. Wyniki analizy przedstawiono na Ryc. 4 – 13 dla naczyń zastawek serca oraz Ryc. 4 – 14 dla płatków. W obu przypadkach liczba komórek martwych na wszystkich matrycach była istotnie wyższa dla tkanek po decelularyzacji metodą D1 niż dla grupy D2. W przypadku naczyń po decelularyzacji enzymatycznej (kontrolne matryce decelularne; D1n) procent komórek martwych wahał się od **7,14 % ± 1,6** do **12,5% ± 4,15** dla matryc D1nGA3 (matryce decelularne traktowane 0,05% roztworem GA). Różnica pomiędzy tymi grupami była istotna statystycznie. Średni procent komórek martwych dla tkanek z grup D1nGA1 (**8,38 % ± 1,6**) i D1nGA2 (**9,16 % ± 2,9**) był zbliżony do wartości kontrolnych (D1n). Po decelularyzacji detergentowej (grupa D2n) największy odsetek martwych komórek rejestrowano w grupie D2nGA3 (**2,5 % ± 0,89**), który różnił się istotnie od wartości kontrolnych (D2n; **0,48 % ± 0,15**). Zaobserwowano także wzrost liczby komórek martwych dla matryc z grup D2nGA1 (**1,36% ± 0,3**) i D2nGA2 (**2,09% ± 0,6**), jednak wartości te nie różniły się istotnie od kontroli (Ryc. 4 - 13).



Ryc. 4-13 Procent komórek martwych po 24h od ich zasiedlenia na decelularnych matrycach naczyń zastawki płucnej (n) w grupach D1n i D2n. D1n/D2n–kontrolne matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na matrycach z grupy D1n; A, B – wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na modyfikowanych matrycach z grupy D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek, pomiędzy wyróżnionymi typami decelularyzacji; test t-Studenta, $p < 0,05$; (N=6).

Podobne tendencje wykazano dla matryc uzyskanych z płatków zastawek (Ryc. 4 - 14). Największy średni odsetek nekrotycznych komórek śródbłónka rejestrowano w grupie D1pGA3 (**18,7 % \pm 1,9**), który różnił się istotnie zarówno od grupy kontrolnej D1p (**10,6 % \pm 3,5**) jak i pozostałych grup traktowanych GA w niższych stężeniach. Także w grupach poddanych decelularyzacji detergentowej (D2) odsetek komórek nekrotycznych w grupie poddanej działaniu najwyższych stężeń GA (D2pGA3; **4,89 % \pm 1,44**) był blisko trzykrotnie wyższy niż w kontroli (D2p). Z kolei procent martwych komórek w grupach D2pGA1 i D2pGA2 nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej. Podobnie jak w przypadku naczyń większą śmiertelność komórek rejestrowano na matrycach D1p niż D2p (Ryc. 4 - 14).



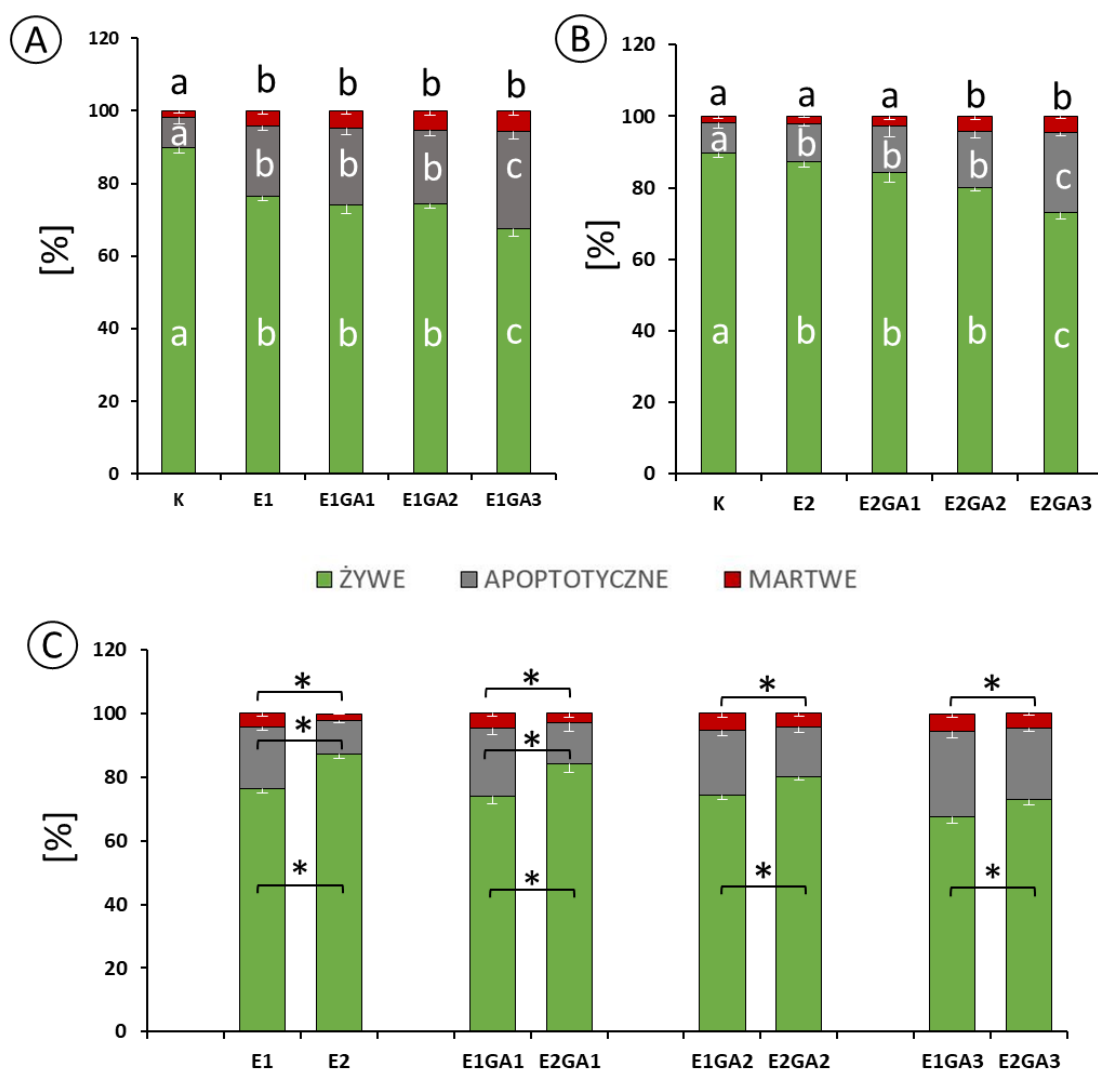
Ryc. 4-14 Procent komórek martwych po 24h od ich zasiedlenia na decelularnych matrycach płatków zastawki płucnej (p) w grupach D1p i D2p. D1p/D2p-kontrolne matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 - matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b - wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na matrycach z grupy D1p; A, B - wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na modyfikowanych matrycach z grupy D2p; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek, pomiędzy wyróżnionymi typami decelularyzacji; test t-Studenta, $p < 0,05$; (N=6).

4.5 Ocena wybranych stężeń aldehydu glutarowego na komórki śródbłónka - badanie cytotoksyczności metodą pośrednią z zastosowaniem ekstraktów.

4.5.1 Analiza cytometryczna żywotności komórek śródbłónka hodowanych w obecności ekstraktów tkankowych

Zaprezentowane na Ryc. 4 – 15, (A, B, C) wykresy przedstawiają procent komórek żywych, martwych oraz apoptotycznych dla poszczególnych rodzajów ekstraktów (oznaczenia ekstraktów zamieszczono w Tab. 3 – 2; rozdział 3.11.1). Próbę kontrolną (K) stanowiły komórki śródbłónka hodowane w standardowych warunkach czyli w obecności medium hodowlanego bez ekstraktów tkankowych. Najniższy odsetek komórek żywych (**67,393 % ± 1,11**) oraz najwyższy odsetek komórek apoptotycznych (**26,98 % ± 2,1**), odnotowano w grupie E1GA3 (Ryc. 4 – 15; A). Wyniki uzyskane dla grup E1, E1GA1 oraz E1GA2 nie różniły się istotnie w obrębie poszczególnych frakcji komórek. Średni odsetek komórek żywych w badanych grupach był istotnie niższy niż w kontroli (K - **89,76% ± 1,35**), podczas gdy odsetek komórek apoptotycznych i martwych istotnie przewyższał ich wartości kontrolne.

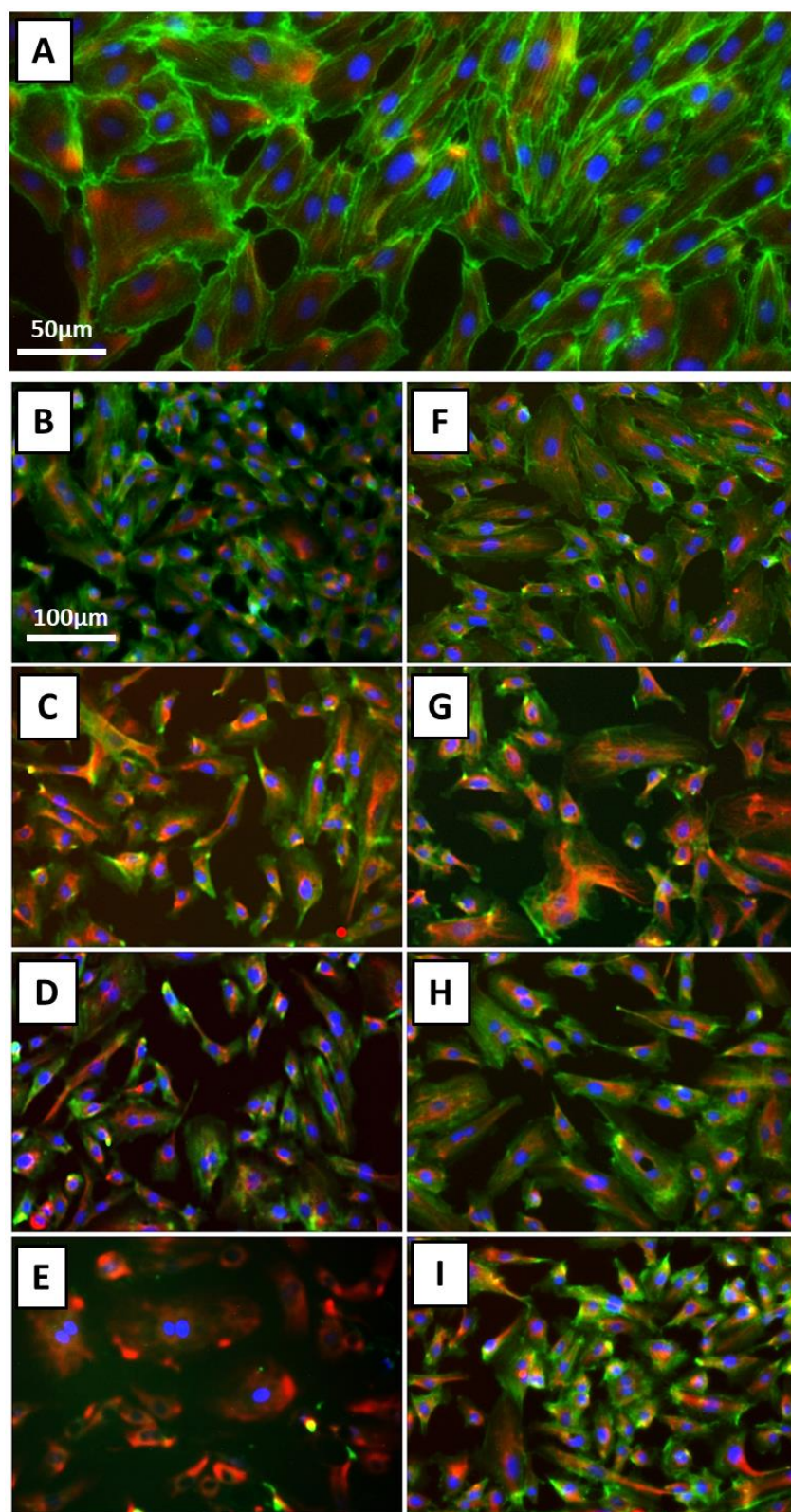
W grupie E2 (Ryc. 4 – 15, B) wykazano istotnie niższy w stosunku do K (**89,76% ± 1,35**) odsetek komórek żywych, który wynosił dla E2 (**87,41% ± 0,63**), E2GA1 (**84,11 % ± 2,52**), E2GA2 (**80,08 % ± 1,12**) . Wykazano również, że liczba komórek apoptotycznych w grupach E2, E2GA1, E2GA2 (odpowiednio **10,43% ± 0,66**; **13,07% ± 2,88**; **15,52% ± 1,68**) była zbliżona, istotnie przewyższając średnie wartości tego parametru w grupie kontrolnej. Największy odsetek komórek martwych i apoptotycznych w grupie E2 zarejestrowano w hodowli komórek poddanych działaniu E2GA3 (odpowiednio: **4,53% ± 0,67** i **22,40% ± 1,08**). Porównując żywotność komórek w grupie E1 oraz E2 (Ryc. 4 – 15, C) wykazano, iż niemal we wszystkich przypadkach (z wyjątkiem grup GA2 i GA3 dla komórek apoptotycznych) odsetek poszczególnych frakcji komórek był istotnie różny na korzyść grupy E2.



Ryc. 4-15 Procent komórek żywych, apoptotycznych oraz martwych, które zostały poddane działaniu ekstraktów tkankowych ($\bar{x} \pm SD$; $N=6$). K – kontrola, komórki hodowane w standardowym medium hodowlanym, E1 –ekstrakt pozyskany z matrycy D1p/D1n; E1GA1 –ekstrakt pozyskany z matrycy D1pGA1/D1nGA1; E1GA2 –ekstrakt pozyskany z matrycy D1pGA2/D1nGA2; E1GA3 –ekstrakt pozyskany z matrycy D1pGA3/D1nGA3; E2 –ekstrakt pozyskany z matrycy D1p/D1n; E2GA1 –ekstrakt pozyskany z matrycy D2pGA1/D2nGA1; E2GA2 –ekstrakt pozyskany z matrycy D2pGA2/D2nGA2; E2GA3 –ekstrakt pozyskany z matrycy D2pGA3/D2nGA3. a, b, c – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie ekstraktów pozyskanych z tkanek w grupie D1 (A); w obrębie ekstraktów pozyskanych z tkanek w grupie D2 (B); Test Tukeya, $p < 0,05$. W pkt C) * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup ekstraktów; test t-Studenta, $p < 0,05$.

4.5.2 Ocena morfologii komórek poddanych działaniu ekstraktów tkankowych

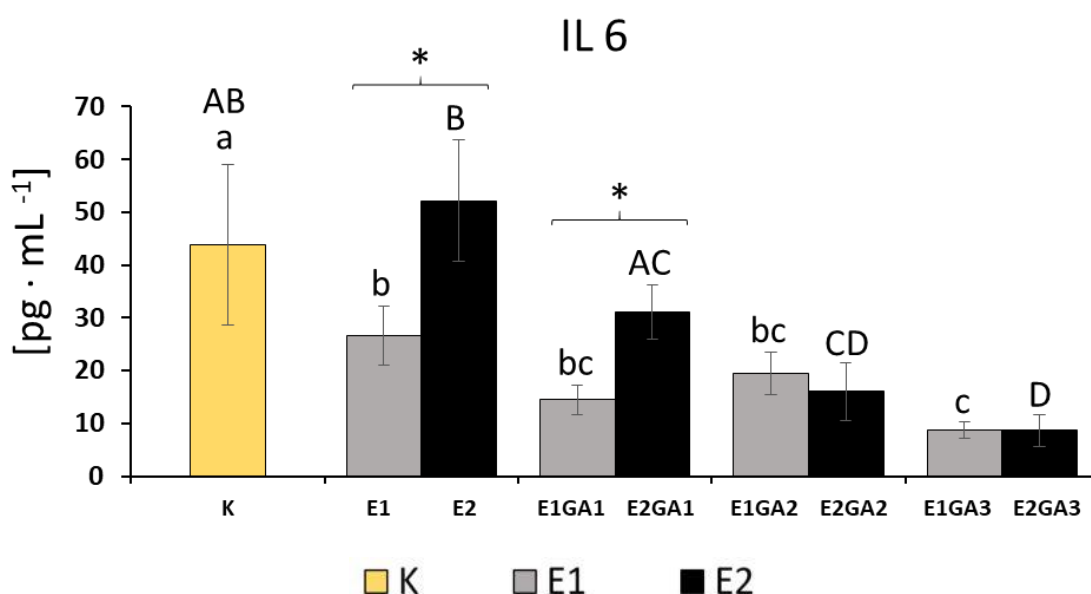
Ocenę morfologii komórek dokonano na podstawie analizy obrazów mikroskopowych cytoszkieletu komórek, uzyskanych po wyznakowaniu barwnikami fluorescencyjnymi. Grupę kontrolną, podobnie jak w badaniu cytometrycznym, stanowiły komórki hodowane w standardowych w medium hodowlanym bez obecności ekstraktu. Natomiast grupy badane stanowiły komórki traktowane ekstraktami tkankowymi, gdzie ekstrakt E1 pozyskany został z matryc decelularnych D1 natomiast E1GA1, E1GA2, E1GA3 – pozyskano z matryc decelularnych D1 modyfikowanych trzema różnymi stężeniami aldehydu glutarowego: GA1, GA2, GA3. Analogicznie przygotowano ekstrakty matryc uzyskanych metodą D2 (oznaczenia ekstraktów rozdział 3.11.1; Tab. 3 – 2). W komórkach tych grup (Ryc. 4 – 16) uwidoczniło się jądro komórkowe (kolor niebieski) oraz filamenty aktynowe (kolor zielony) i filamenty pośrednie (kolor czerwony). W grupie kontrolnej (K) oraz grupie komórek traktowanych ekstraktami E1, E1GA1 i E2, E2GA1, E2GA2 (Ryc. 4 -16, A - C oraz F – H) zaobserwowano komórki o prawidłowej morfologii, niektóre w trakcie podziału. We wnętrzu komórek tych grup zanotowano obecność włókien naprężeniowych. W przypadku grupy kontrolnej (K) dodatkowo aktyna tworzyła wyraźne obrzeże korowe ułożone na obwodzie komórki odznaczające się intensywnym zielonym kolorem. Zaobserwowano także redystrybucję filamentów pośrednich, które w przypadku kontroli (K) i komórek traktowanych E2 charakteryzowały się równomiernym rozmieszczeniem w komórce natomiast w pozostałych grupach rozmieszczone były bliżej jądra komórkowego co manifestowane było intensywniejszym zabarwieniem wimentyny wokół jądra. Wielkość komórek wahała się w zależności od ich zagęszczenia – w miejscach mniej zagęszczonych komórki śródbłonna rozpościerały się zajmując większą powierzchnię niż w przypadku komórek o dużym zagęszczeniu. Można także było zaobserwować komórki w trakcie migracji. Zmiany w obrębie cytoszkieletu wystąpiły w grupie E1GA3, bowiem w komórkach wykazano słabe zabarwienie lub brak wybarwienia filamentów aktynowych. Porównując grupę E1 (Ryc. 4 – 16, B – E) z grupą E2 (Ryc. 4 – 16, F – I) wykazano, że komórki z grupy E2 cechują się większym stopniem organizacji, w porównaniu do grupy E1. W grupie E1GA2 (Ryc. 4 – 16, D) zaobserwowano również, że komórki pomimo niskiego zagęszczenia miały mniejsze rozmiary od komórek z grupy komplementarnej E2GA2 (Ryc. 4 – 16, H).



Ryc. 4-16 Przykładowe zdjęcia komórek śródbłónka traktowanych poszczególnymi ekstraktami. Kolor zielony – filamenty aktynowe; kolor czerwony – filamenty pośrednie; kolor niebieski – jądra komórkowe. A – kontrola (K), komórki hodowane w standardowym medium hodowlanym; B – komórki traktowane E1; C – komórki traktowane E1GA1; D – komórki traktowane E1GA2; E – komórki traktowane E1GA3; F – komórki traktowane E2; G – komórki traktowane E2GA1; H – komórki traktowane E2GA2; I – komórki traktowane E2GA3; (N=6). (Wyjaśnienie oznaczeń ekstraktów rozdział 3.11.1; Tab. 3 – 2)

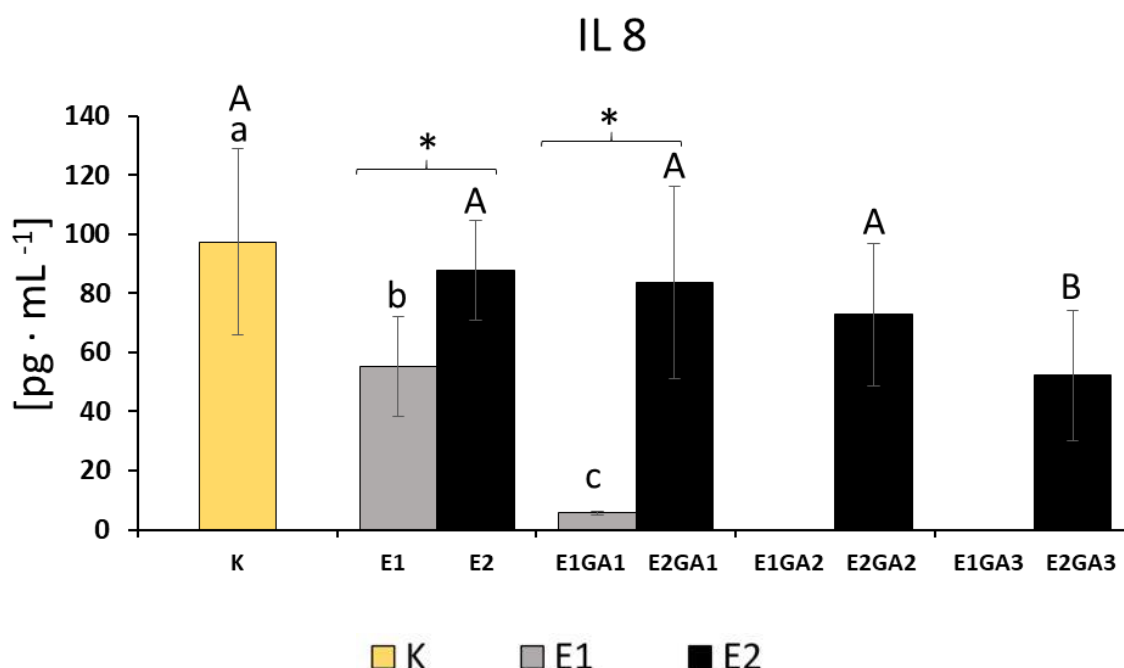
4.5.3 Wpływ ekstraktów tkankowych na sekrecję cytokin przez komórki śródbłonna

Stężenie IL-6 notowane w grupach: E1, E1GA1, E1GA2 oraz E1GA3 było istotnie niższe od średniej wartości tego parametru w grupie kontrolnej (**43,90 pg · mL⁻¹ ± 15,17**) odpowiednio o **40%, 68%, 56%** oraz **80%** (Ryc. 4 – 17). Stężenia cytokiny w grupach E2 i E2GA1 nie różniły się istotnie od wartości kontrolnych, jednak wartości te były istotnie statystycznie wyższe od stężeń notowanych dla grupy E1 oraz E1GA1. Stężenie IL – 6 w grupach E2GA2 i E2GA3 nie różniły się istotnie od grupy E1 i były istotnie niższe od stężeń rejestrowanych w próbie kontrolnej (Ryc. 4 – 17).



Ryc. 4-17 Średnie stężenie IL6 [$x \pm SD$, $N=6$; pg · mL⁻¹] wydzielonej przez komórki, hodowane w obecności ekstraktów tkankowych. K – kontrola, komórki które hodowano w standardowym medium hodowlanym, E1 – komórki hodowane z ekstraktem pozyskanym z matrycy D1p/D1n; E1GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D1pGA1/D1nGA1; E1GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D1pGA2/D1nGA2; E1GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D1pGA3/D1nGA3; E2 – komórki hodowane z ekstraktem pozyskanym z matrycy D2p, D2n; E2GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D2pGA1/D2nGA1; E2GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D2pGA2/D2nGA2; E2GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D2pGA3/D2nGA3. a, b, c – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D1; A, B, C - wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D2; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup, pomiędzy metodami decelularyzacji tkanki; test t-Studenta, $p < 0,05$

Najwyższe stężenie IL-8 (Ryc. 4 – 18) odnotowano w próbach grupy kontrolnej K (**97,46 pg/mL ± 31,58**). Stężenie IL-8 w grupie E1 było blisko dwukrotnie niższe niż w kontroli, podczas gdy w grupie E1GA1 różnica ta była aż 17-krotna. Dla ekstraktów grupy E1GA2 i E1GA3 nie odnotowano sekrecji tej cytokiny. Odmienną tendencję wykazano w próbach z grup poddanych decelularyzacji detergentowej. Poziom IL-8 w tylko grupie E2GA3 był 2 – krotnie niższy niż w kontroli, podczas gdy w grupach: E2, E2GA1 i E2GA2 był zbliżony do poziomowi próby kontrolnej (Ryc. 4 – 18).

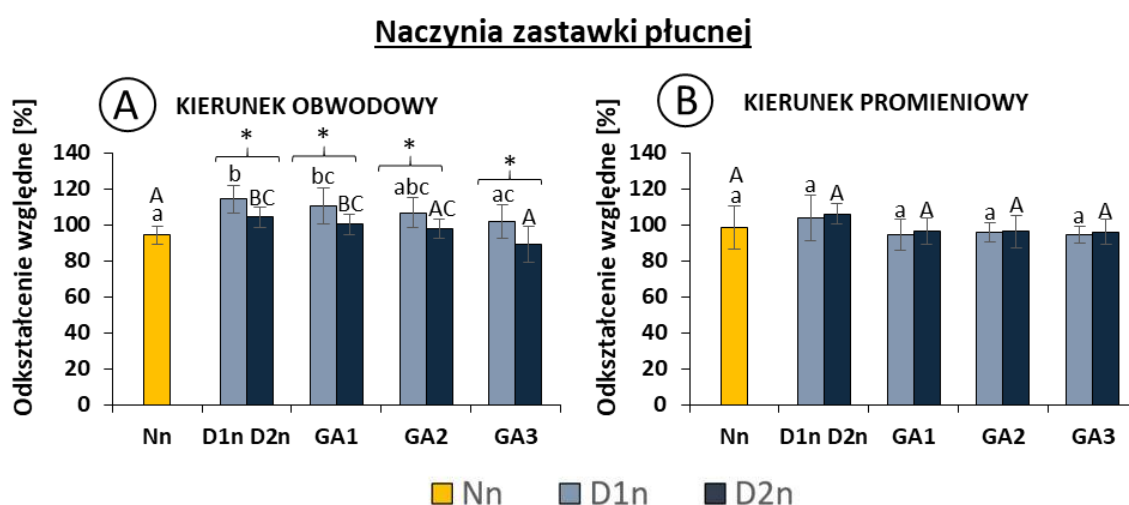


Ryc. 4-18 Średnie stężenie IL8 [$x \pm SD$, N=6; pg · mL⁻¹] wydzielonej przez komórki, hodowane w obecności ekstraktów tkankowych. K – kontrola, komórki które hodowano w standardowym medium hodowlanym, E1 – komórki hodowane z ekstraktem pozyskanym z matrycy D1p/D1n; E1GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D1pGA1/D1nGA1; E1GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D1pGA2/D1nGA2; E1GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D1pGA3/D1nGA3; E2 – komórki hodowane z ekstraktem pozyskanym z matrycy D2p/D2n; E2GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D2pGA1/D2nGA1; E2GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D2pGA2/D2nGA2; E2GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matrycy D2pGA3/D2nGA3. a, b, c – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D1; A, B, C – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D2; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup, pomiędzy metodami decelularyzacji tkanki; test t-Studenta, $p < 0,05$

4.6 Ocena właściwości mechanicznych decelularnych płatków zastawek serca i naczyń zastawek płucnych sieciowanych GA

4.6.1 Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na ich odkształcenie względne w punkcie maksymalnego naprężenia próbki

W celu zbadania wpływu zastosowanych stężeń aldehydu glutarowego na właściwości biomechaniczne decelularnych tkanek wykonano próbę statycznego rozciągania zarówno dla płatków jak i naczyń zastawki płucnej serca. Badania prowadzono w kierunku obwodowym i promieniowym.

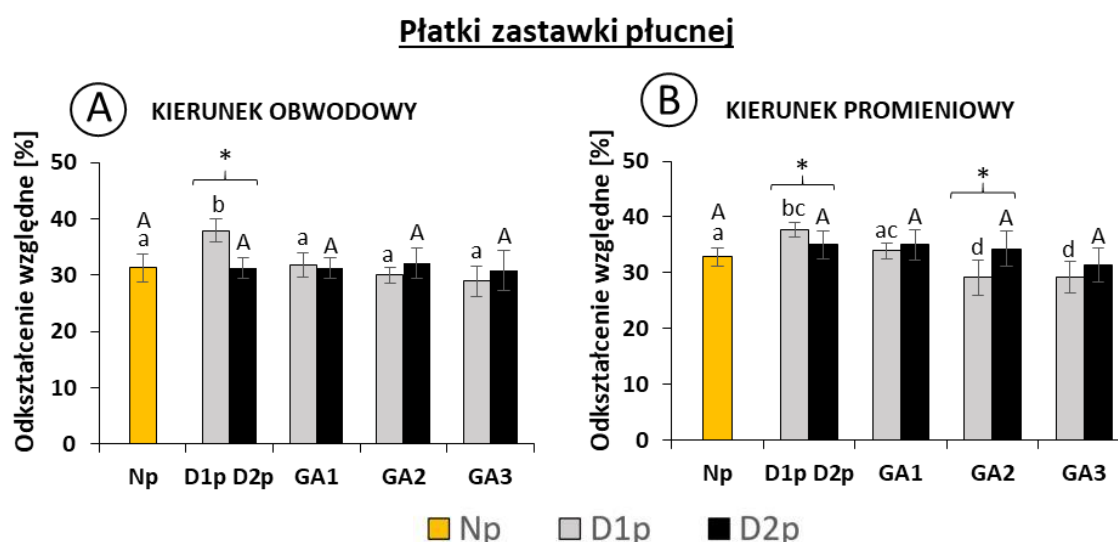


Ryc. 4-19 Odkształcenie względne [%] dla fragmentów naczyń (n) zastawki płucnej badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n /D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA3. a, b, c, d – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1n natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2n; Test Tukey $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta $p < 0,05$.

Fragmenty naczyń płucnych poddawane badaniu w kierunku obwodowym (Ryc. 4 – 19; A) po decellularyzacji z zastosowaniem metody D1n (**114,28 % ± 7,54**), metody D2n (**104,22 % ± 5,70**) oraz sieciowane z grupy D1nGA1 (**110,46 % ± 9,79**) i D2nGA1 (**100,39 % ± 5,62**) przejawiały istotnie wyższe odkształcenie względne, w porównaniu do tkanki natywnej (Nn) –(**94,18 % ± 4,9**). W przypadku tkanek decelularnych sieciowanych w obrębie grup GA2 i GA3 wykazano obniżenie odkształcenia względnego, w przypadku obu typów decelularyzacji, do wartości wyznaczonych dla tkanki natywnej (D1nGA2 – **106,69 % ± 8,11**; D2nGA2 – **97,66 % ± 5,42**; D1nGA3 – **101,93 % ± 9,37**; D2nGA3 – **89,07 % ± 9,81**). Zanotowano także istotne różnice w poziomie analizowanego parametru w zależności od typu decelularyzacji w obrębie danej modyfikacji (Ryc. 4 – 19; A). Dla naczyń

badanych w kierunku promieniowym nie wykazano istotnych różnic w wielkości odkształcenia względnego pomiędzy analizowanymi grupami (Ryc. 4 – 19; B).

Fragmenty płatków zastawki badane w kierunku obwodowym generalnie nie wykazywały różnic w wartości odkształcenia, w porównaniu do kontroli (grupa Np – **31,29** \pm 2,48%). Jedynie w przypadku tkanek z grupy D1p (**37,86** \pm 2,03 %) stwierdzono większy stopień odkształcenia w porównaniu zarówno do kontroli natywnej jak i tkanek z grupy D2p (**31,18** \pm 1,8%) (Ryc. 4 -20; A). Próbkki badane w kierunku promieniowym po decelularyzacji metodą D1 oraz sieciowane z grup D1pGA2 i D1pGA3 różniły się istotnie od kontroli natywnej (Np – **32,80** % \pm 1,60). Zaobserwowano dla nich wzrost odkształcenia po decelularyzacji oraz istotne obniżenie wydłużenia po sieciowaniu (Ryc. 4 – 20; B). W przypadku matryc płatków modyfikowanych metodą D2 oraz sieciowanych aldehydem glutarowym w grupach: D2pGA1 , D2pGA2 i D2pGA3 (**31,42** % \pm 3,03) wydłużenie względne było zbliżone do wartości notowanych dla tkanki natywnej (Ryc. 4 – 20; B).



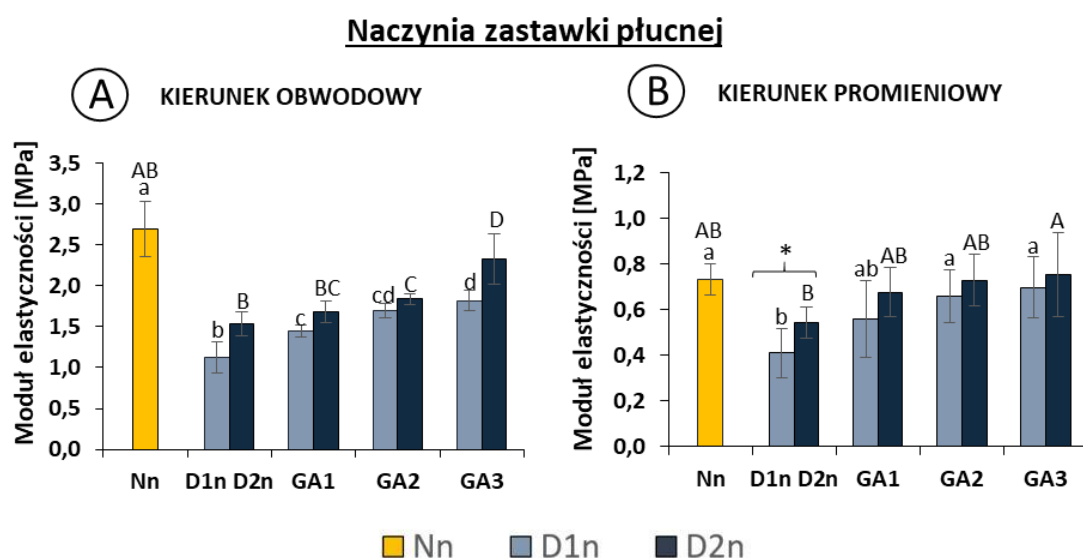
Ryc. 4-20 Odkształcenie względne [%] dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np –tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek po D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek po D2p; Test Tukeya $p < 0,05$.* - zaznaczono różnice istotne statystycznie między D1p a D2p w obrębie komplementarnych grup tkanek; test t-Studenta $p < 0,05$.

4.6.2 Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na moduł elastyczności (MY) i moduł sieczny (Ms)

Z wykresów naprężenie/odkształcenie odczytano wartości dla modułu elastyczności (*ang. Young modulus*; MY) oraz modułu siecznego (*ang. secant modulus*; Ms). Wartość MY dla

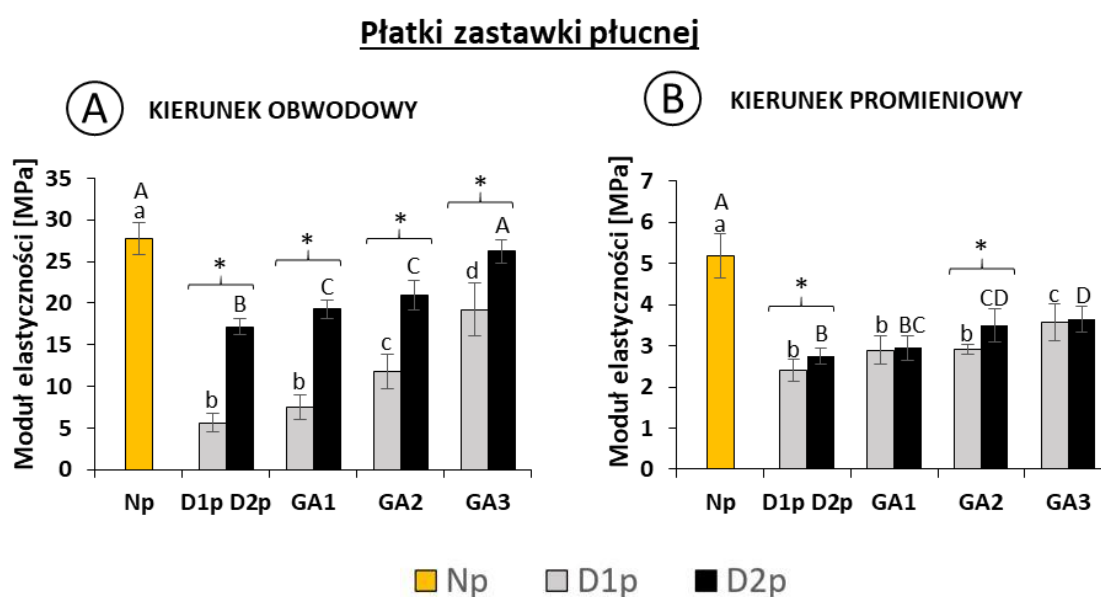
naczyń zastawek serca mierzona w kierunku obwodowym była istotnie niższa, w porównaniu do tkanek natywnych ($Nn - 2,69 \pm 0,34$ MPa), zarówno w przypadku tkanek decelularnych z grup D1n (o **58%**) i D2n (o **43%**) oraz traktowanych glutaraldehydem (D1nGA1 - o **47%**; D2nGA1 - o **38%**), GA2 (D1nGA2 - o **38%**; D2nGA2 - o **32%**) GA3 (D1nGA3 - o **32%**; D2nGA3 - o **14%**), (Ryc. 4 – 21, A).

Badanie naczyń w kierunku promieniowym (Ryc. 4 – 21; B) wykazało obniżenie wartości modułu elastyczności dla tkanek z grupy D1n oraz D2n, w porównaniu do próby natywnej ($Nn - 0,79 \pm 0,07$ MPa) odpowiednio o **48%** i **32%**, przy czym wartość analizowanego parametru dla matrycy z grupy D2n była istotnie wyższa niż w grupie D1n, lecz nie różniła się istotnie od kontroli (Nn). Pozostałe matryce dla obu typów decelularyzacji nie wykazywały różnic istotnych w wielkości modułu elastyczności wobec tkanki natywnej.



Ryc. 4-21 Wartość modułu elastyczności ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między grupami D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$.

W przypadku płatków badanych w kierunku obwodowym wartość MY wynosiła $27,7 \pm 1,93$ MPa dla tkanki natywnej (Np) i była istotnie wyższa, w porównaniu do wartości modułu elastyczności, które rejestrowano dla tkanek decelularnych z grupy D1p blisko pięciokrotnie i o **38 %** przewyższała wartość MY notowany w grupie D2p (Ryc. 4 – 22; A). Niezależnie od sposobu decelularyzacji istotnie niższą, względem kontroli natywnej wartość tego parametru wykazano dla wszystkich decelularnych tkanek sieciowanych stężeniem 0,0125% GA (D1pGA1 – o **72,93%**; D2pGA1 – o **30,5%**) oraz stężeniem 0,025%



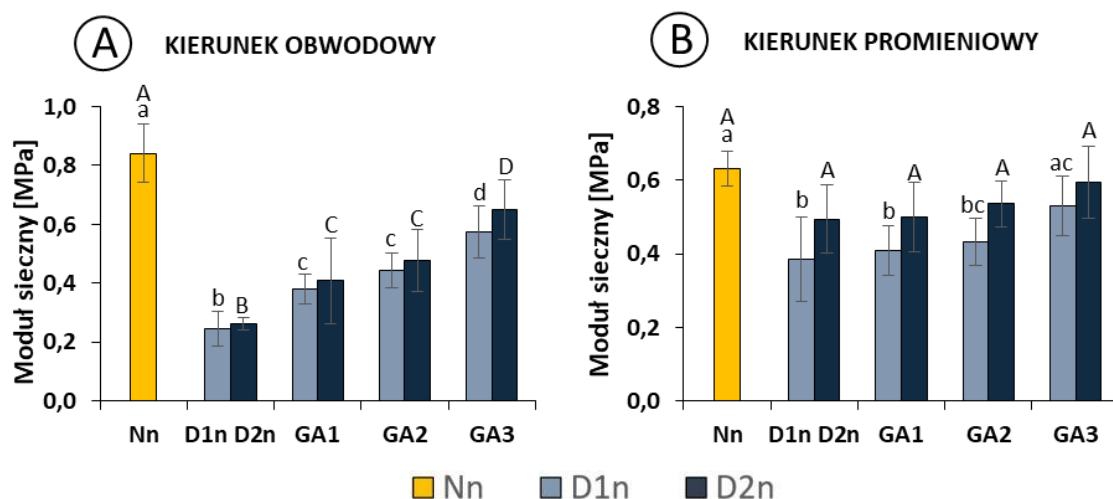
Ryc. 4-22 Wartość modułu elastyczności ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d- wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1p natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2p; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1 a D2; test t-Studenta, $p < 0,05$.

GA (D1pGA2 - o **57,55%**; D2pGA2 – o **24,55%**). Wykazano również zwiększenie wartości MY jedynie dla matrycy z grupy D2pGA3 ($26,21 \pm 1,39$ MPa), która była zbliżona do wartości MY tkanek natywnych. Analiza statystyczna wskazała także, że wszystkie wartości modułu Younga dla tkanek z grupy D2 były istotnie wyższe od wartości notowanych dla tkanek poddanych decelularyzacji metodą D1. Wszystkie fragmenty płatków badane w kierunku promieniowym miały istotnie niższy moduł Younga od tkanki natywnej (Np – $5,18 \pm 0,53$) (Ryc. 4 – 22; B). Tkanki poddane decelularyzacji enzymatycznej cechowały się niższą wartością modułu elastyczności w grupach D1p i D1pGA2, w porównaniu do tkanek poddanych decelularyzacji detergentowej z grup komplementarnych (Ryc. 4 – 22; B).

Wartości M_s wszystkich prób naczyń uzyskane podczas pomiaru w kierunku obwodowym były istotnie niższe od wartości notowanych dla tkanki natywnej ($0,84 \pm 0,10$ MPa). Niezależnie od sposobu decelularyzacji wykazano także proporcjonalne zwiększenie wartości M_s wraz ze wzrostem zastosowanych stężeń GA (Ryc. 4 – 23; A). Badanie w kierunku promieniowym ujawniło istotne obniżenie wartości badanego parametru dla tkanek delcelularnych z grupy D1n oraz traktowanych glutaraldehydem z grup D1nGA1 i D1nGA2 w stosunku do tkanki natywnej odpowiednio o **40%**, **35%** oraz **32%**. Wartość modułu siecznego zmierzona w tkankach z grupy D1nGA3 była zbliżona do wartości notowanych dla tkanek natywnych (Ryc. 4 – 23; B). Nie zaobserwowano natomiast różnic w poziomie analizowanego parametru między tkanką natywną, a tkankami poddanymi decelularyzacji z zastosowaniem metody D2 oraz poddanych sieciowaniu z użyciem GA (Ryc. 4 – 23; B).

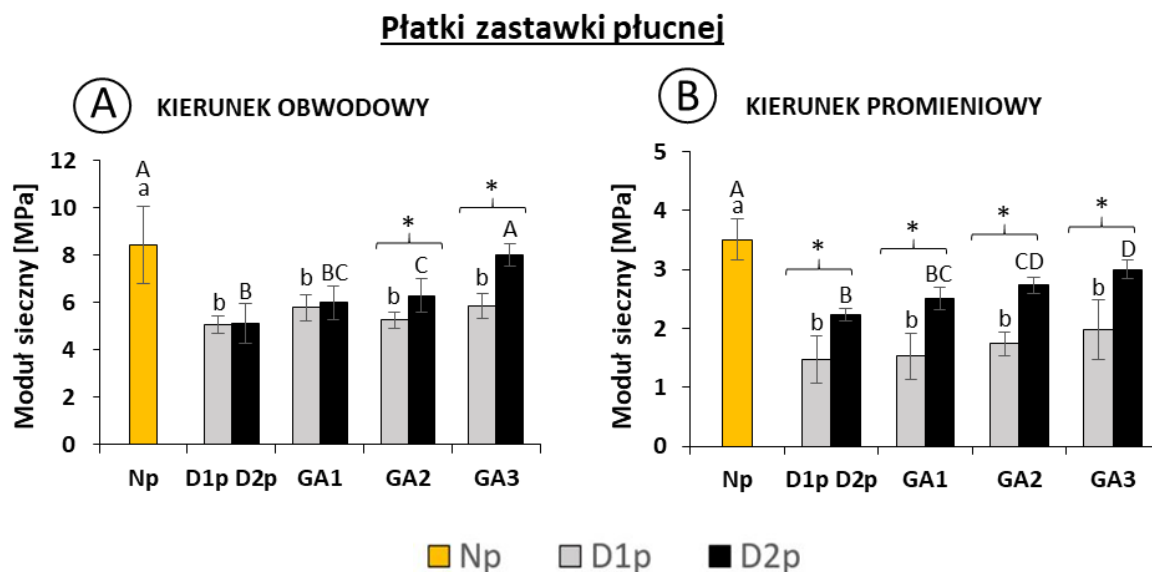
Moduł sieczny płatków zastawek mierzony w kierunku obwodowym był istotnie niższy zarówno w przypadku tkanek z grupy D1p jak i D2p o **40 %**, w porównaniu do tkanki natywnej (grupa Np $8,45 \pm 1,63$ MPa)(Ryc. 4 – 24, A). Sieciowanie GA nie wpłynęło znacząco na zwiększenie wielkości M_s pomiędzy poszczególnymi próbami w obrębie grupy tkanek poddanych decelularyzacji z zastosowaniem metody D1. Zwiększenie wartości tego parametru wykazano natomiast dla tkanek z grupy D2p traktowanych różnymi stężeniami

Naczynia zastawki płucnej



Ryc. 4-23 Wartość modułu siecznego ($\bar{x} \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$.

GA. W grupie, gdzie stosowano najwyższe stężenie GA (GA3) wartość MS była zbliżona do wartości tego parametru w tkance natywnej (grupa Np).



Ryc. 4-24 Wartość modułu siecznego ($\bar{x} \pm \text{SD}$; MPa) dla fragmentów płatków (p) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d- wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$.

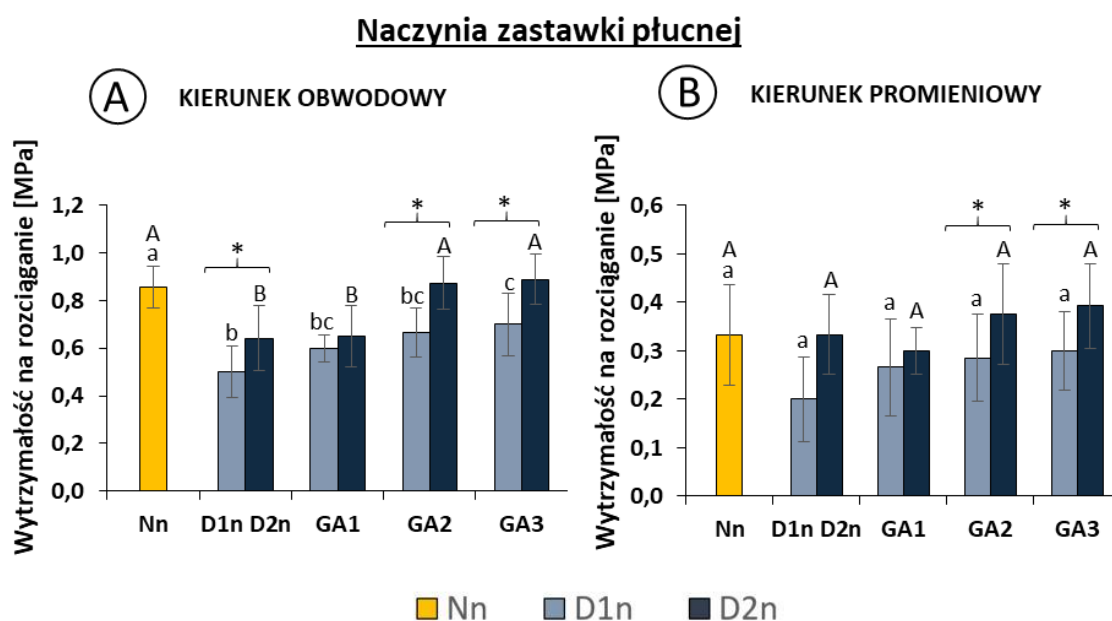
Wartość modułu siecznego dla wszystkich płatków w obrębie grup poddanych decelularyzacji enzymatycznej (D1p) badanych w kierunku promieniowym istotnie zmniejszyła się w stosunku do kontroli natywnej (Np). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku grupy D2p, jednakże zastosowanie wzrastających stężeń GA wpłynęło na stopniowy wzrost wielkości mierzonego parametru. Wykazano również istotne różnice pomiędzy typami decelularyzacji D1p i D2p, w obrębie wybranych stężeń GA (Ryc. 4 – 24; B).

4.6.3 Wytrzymałość na rozciąganie

Fragmenty naczyń poddane decelularyzacji z zastosowaniem metody D1, badane w kierunku obwodowym charakteryzowały się niższą o **42%** wytrzymałością na rozciąganie od natywnych tkanek kontrolnych (grupa Nn; **0,86 \pm 0,09 MPa**). Istotnie zwiększyła się jednak wytrzymałość na rozciąganie tych tkanek po traktowaniu GA3, w porównaniu do tkanki z grupy D1n (Ryc. 4 – 25; A). Wykazano, że decelularyzacja detergentowa (grupa D2n) również spowodowała obniżenie wytrzymałości naczyń zastawek serca (o **28%**) badanych w kierunku obwodowym, w odniesieniu do wartości uzyskanych dla tkanki natywnej. Zastosowanie GA w grupach GA2 i GA3 spowodowało

zwiększenie poziomu analizowanego parametru do wartości zbliżonych dla tkanki natywnej (grupa Nn). Wytrzymałość na rozciąganie tkanek z grupy D1n oraz sieciowanych glutaraldehydem z grup D1nGA2 i D1nGA3 była istotnie niższa niż tkanek z grup D2n, D2nGA2, D2nGA3 (Ryc. 4 – 25; A).

Żadna z modyfikacji tkanki nie wpłynęła znacząco na obniżenie wytrzymałości matrycy badanych w kierunku promieniowym. Zanotowano jedynie istotne różnice w poziomie omawianego parametru pomiędzy tkankami decelularnymi z grupy D1n i traktowanymi GA z grup D1nGA2 i D1nGA3, a komplementarnymi tkankami z grupy D2n (Ryc. 4 – 25; B).

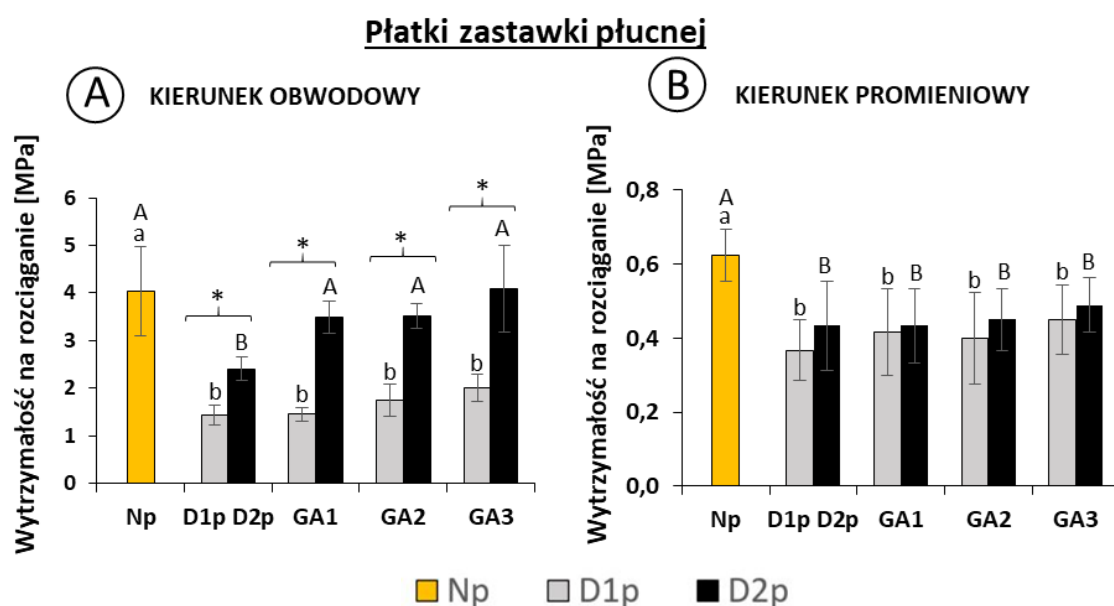


Ryc. 4-25 Wartość wytrzymałości na rozciąganie ($\bar{x} \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 – matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 – matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * – zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$.

Wytrzymałość na rozciąganie płatków zastawek po decelularyzacji (grupa D1p), którą badano w kierunku obwodowym, istotnie obniżyła się w stosunku do kontroli (Nn) o **65,26 %** (Ryc. 4 – 26; A). Wielkość tego parametru nie zmieniła się po zastosowaniu GA w wybranych stężeniach. Odmienną tendencję zaobserwowano w przypadku matryc płatków z grupy D2p, których wytrzymałość na rozciąganie po decelularyzacji zmniejszyła się o 40% w odniesieniu do tkanki natywnej . Wszystkie zastosowane stężenia GA spowodowały natomiast zwiększenie wytrzymałości tkanek na rozciąganie. Największy efekt uzyskano w

grupie D2pGA3 ($4,09 \pm 0,91$ MPa), bowiem wartość mierzonego parametru była bliska tej, którą uzyskano w grupie kontrolnej.

W przypadku pozostałych grup (D2pGA1, D2pGA2) wytrzymałość tkanek na rozciąganie była tylko o 13 % niższa niż w kontroli. Wytrzymałość na rozciąganie tkanek z grupy D2p była istotnie wyższa niż tkanek z grupy D1p. (Ryc. 4 – 26; A). W przypadku wszystkich tkanek badanych w kierunku promieniowym wykazano obniżenie wytrzymałości na rozciąganie, w porównaniu z tkanką natywną i brak istotnych różnic pomiędzy danymi grupami (Ryc. 4 – 26; B).

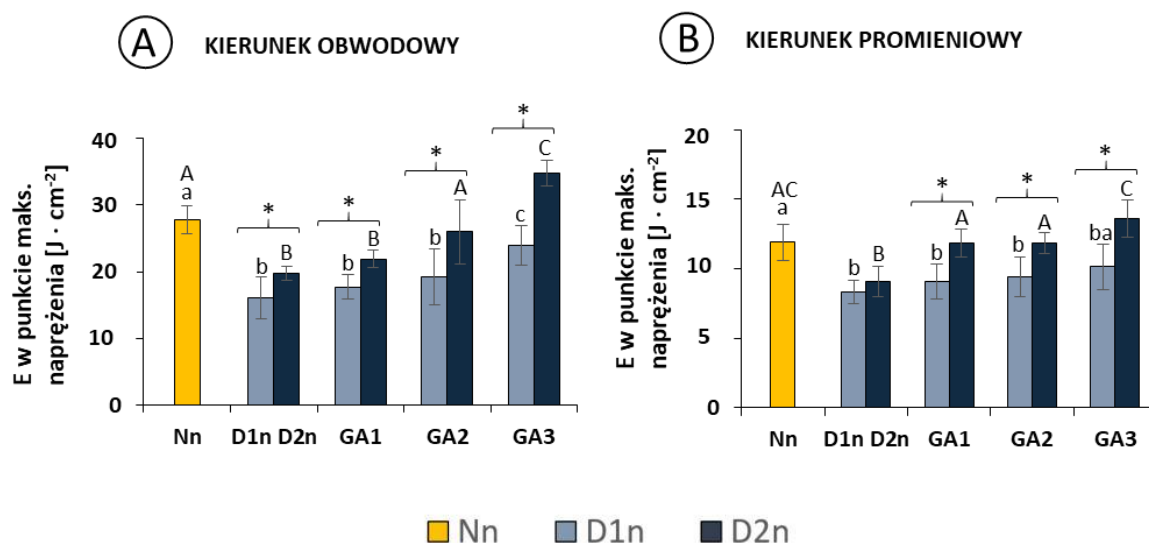


Ryc. 4-26 Wytrzymałości na rozciąganie ($\bar{x} \pm \text{SD}$; MPa) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$.

4.6.4 Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na energię w punkcie maksymalnego naprężenia

Energia w punkcie maksymalnego naprężenia dla naczyń z grupy D1n oraz sieciowanych matryc z grup D1nGA1, D1nGA2 oraz D1nGA3 była istotnie niższa od kontroli natywnej (Nn; $27,79 \pm 2,03 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) odpowiednio o 42%, 37%, 31% i 14%. Wartość tego parametru dla prób z grupy D2n i D2nGA1 również obniżyła się w stosunku do kontroli Nn, odpowiednio o 29% i 21%. Energia w punkcie maksymalnego naprężenia zmierzona dla prób z grup D2nGA2 i D2nGA3 nie różniła się istotnie od wartości notowanych dla tkanek natywnych. Wszystkie matryce z grupy D1n różniły się istotnie od matryc z grupy D2n (Ryc. 4 – 27; A).

Naczynia zastawki płucnej

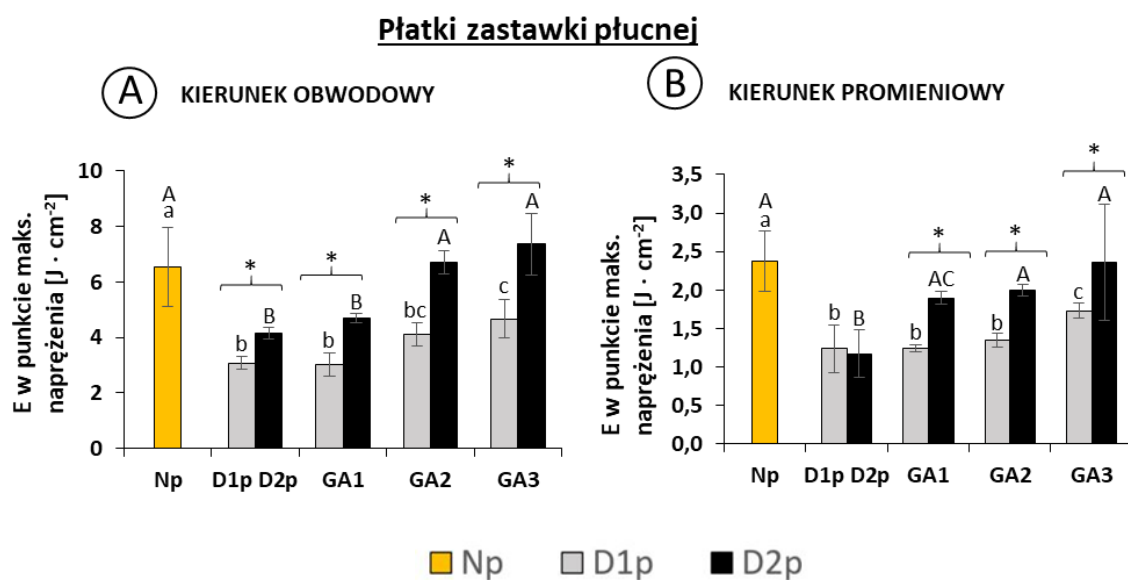


Ryc. 4-27 Wartość energii (E) w punkcie maksymalnego naprężenia ($x \pm SD$; $J \cdot cm^{-2}$) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n – matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d- wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$.

Wartość energii w punkcie maksymalnego naprężenia dla naczyń z grup D1n i D2n badanych w kierunku promieniowym obniżyła się istotnie, w porównaniu do tkanek natywnych (Nn – $11,89 \pm 1,29 J \cdot cm^{-2}$) odpowiednio o **30%** i **24%**. Wartość energii w punkcie maksymalnego naprężenia dla naczyń z grupy D2n traktowanych GA była istotnie wyższa niż w komplementarnych grupach poddanych decelularyzacji enzymatycznej (grupa D1n) (Ryc. 4 – 27; B).

Energia w punkcie maksymalnego naprężenia mierzona dla natywnych płatków (grupa Np) badanych w kierunku obwodowym wynosiła $6,54 \pm 1,41 J \cdot mm^{-2}$ była istotnie wyższa od wartości otrzymanych dla wszystkich matryc decelularnych z grup D1p i D1pGA1 o **55%** oraz dla grup D1pGA2 i D1pGA3 odpowiednio o **37%** i **29%** (Ryc. 4 – 28; A). Podobną tendencję przejawiały matryce z grupy D2p oraz D2pGA1, których energia w punkcie maksymalnego naprężenia była odpowiednio o **36%** i **28%** niższa niż w tkance natywnej. Tkanki sieciowane z grup D2pGA2 i D2pGA3 nie różniły się istotnie od kontroli. W odniesieniu do omawianego parametru wykazano również, że wszystkie tkanki modyfikowane z grupy D1p różniły się istotnie od tkanek z grupy D2p w obrębie danej modyfikacji (Ryc. 4 – 28; A).

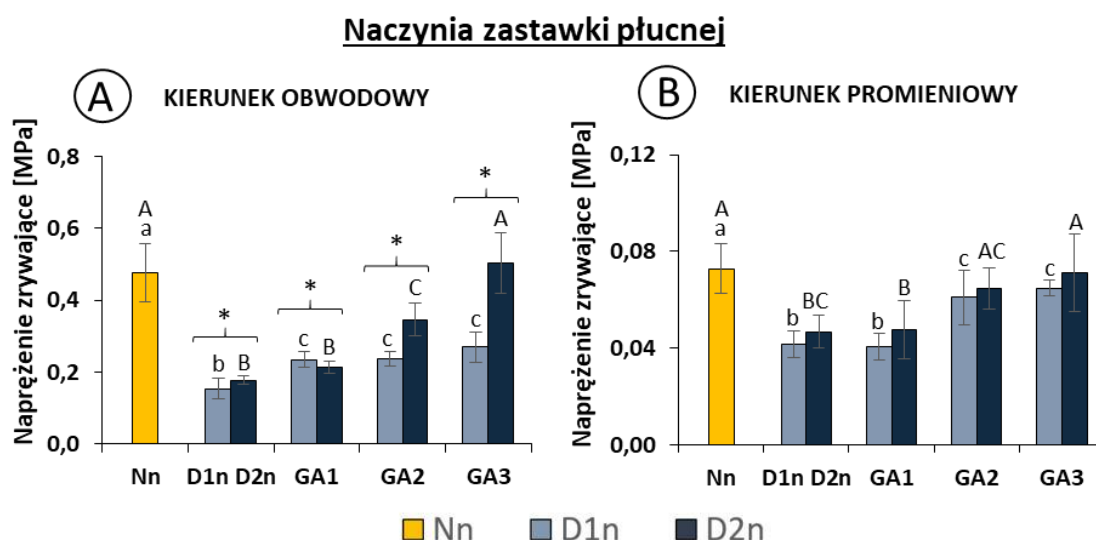
Płatki z grupy D1p badane w kierunku promieniowym również charakteryzowały się blisko **50%** obniżeniem energii w punkcie maksymalnego naprężenia, w porównaniu do próby kontrolnej (Np; $2,37 \pm 0,39 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$). Także matryce z grupy D2p miały istotnie niższą wartość energii w punkcie maksymalnego naprężenia (o **49%**) od płatków natywnych, natomiast rusztowania sieciowane miały zbliżone wartości mierzonego parametru do kontroli natywnej (Ryc. 4 – 28; B).



Ryc. 4-28 Wartość energii (E) w punkcie maksymalnego naprężenia ($x \pm \text{SD}$; $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$.

4.6.5 Wpływ modyfikacji tkanek zastawki płucnej na wartość naprężenia w momencie zrywania próbki

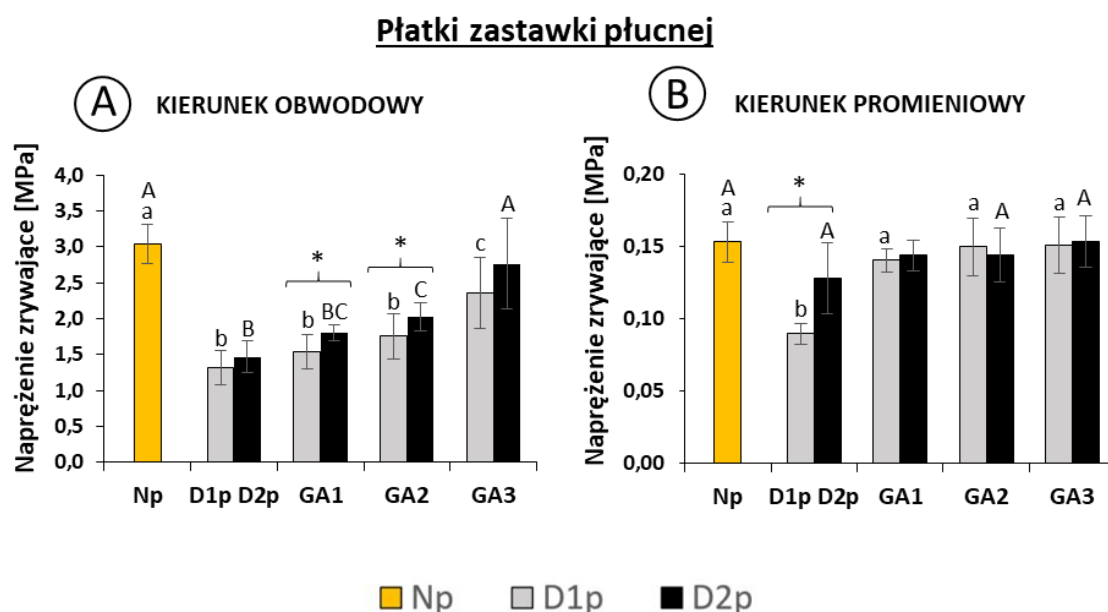
Naprężenie zrywające zarejestrowane dla naczyń badanych w kierunku obwodowym obniżyło się istotnie względem kontroli (Nn; $0,47 \pm 0,81$ MPa) o **67,57%, 51,57%, 50,42%, 43,37%** odpowiednio w grupach: D1n, D1nGA1, D1nGA2, D1nGA3. Matryce z grupy D2 różniły się istotnie od tkanek z grupy D1, zarówno przed jak i po sieciowaniu GA. Zanotowano również wzrost wartości naprężenia zrywającego wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia GA (Ryc. 4 – 29, A). Próbki naczyń z grupy D1n badane w kierunku promieniowym przejawiały o **41%** niższą wartość naprężenia zrywającego w stosunku do kontroli Nn ($0,07 \pm 0,01$ MPa). Podobne właściwości wykazano dla matryc decelularnych z grup: D2n (obniżenie o **33%**) oraz sieciowanych z grup D2nGA1 (obniżenie o **29%**) (Ryc. 4 – 29; B).



Ryc. 4-29 Wartość naprężenia w momencie zerwania ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$.

Fragmenty płatków zastawki serca z grupy D1p dla pomiarów wykonanych w kierunku obwodowym charakteryzowały się średnio ponad dwukrotnie niższą wartością naprężenia zrywającego w odniesieniu do kontroli (Np.; $3,04 \pm 0,27$ MPa) (Ryc. 4 – 30; A). Także w pozostałych grupach doświadczalnych: D1pGA1, D1pGA2, D1pGA3 naprężenie zrywające było niższe niż w kontroli natywnej odpowiednio o **49,67%, 42,43%, 22,40 %**. Decelularyzacja detergentowa (grupa D2p) również spowodowała istotne obniżenie wartości naprężenia zrywającego, w porównaniu do kontroli, jednak po sieciowaniu GA w

najwyższym zastosowanym stężeniu wartość omawianego parametru zmierzona dla matryc z grupy D2pGA3 ($2,76 \pm 0,63$ MPa) osiągnęła wynik zbliżony do wartości kontrolnych (Np) (Ryc. 4 – 30; A). W przypadku tkanek badanych w kierunku promieniowym istotne obniżenie wartości naprężenia zrywającego wobec tkanki natywnej (Np – $0,15 \pm 0,01$) wystąpiło tylko w grupie D1p (o 40%). Wartości naprężenia wyznaczone dla tkanek z pozostałych grup nie różniły się istotnie od kontroli natywnej (Ryc. 4 – 30; B).



Ryc. 4-30 Wartość naprężenia w momencie zerwania ($\bar{x} \pm SD$; MPa) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$.

4.6.6 Analiza czynnikowa udziału zastosowanych modyfikacji tkanki na właściwości mechaniczne zastawki płucnej

Wśród wyodrębnionych zmiennych grupujących dla odkształcenia względnego w punkcie maksymalnego naprężenia fragmentów naczyń (Tab. 4 - 1) największy wpływ na występowanie różnic między modyfikowanymi tkankami miał kierunek cięcia tkanki sprzężony z typem decelularyzacji. Istotny wpływ na wystąpienie różnic pomiędzy wyróżnionymi grupami miał także kierunek cięcia, zastosowane stężenie GA oraz typ decelularyzacji. W przypadku takich parametrów jak: moduł elastyczności, energia w punkcie maksymalnego naprężenia, wytrzymałość na rozciąganie oraz naprężenie zrywające o występowaniu istotnych różnic decydował głównie kierunek cięcia tkanki naczyń. Z kolei największy efekt na wielkość zmian modułu siecznego w badanych grupach doświadczalnych wywierało stężenie GA.

Tab. 4-1 Wyniki analizy wariancji zmian wartości parametrów opisujących wybrane właściwości biomechaniczne decelularnych i modyfikowanych GA tkanek naczyń zastawki płucnej.

Zmienna grupująca	Odkształcenie względne w punkcie maksymalnego naprężenia			Moduł elastyczności (MY)			Moduł sieczny (Ms)		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
kierunek cięcia	953,278	15,352	<0,001	38,427	1660,870	<0,001	0,090	12,477	0,001
typ decelularyzacji	688,701	11,091	0,001	1,586	68,528	<0,001	0,168	23,200	<0,001
stężenie GA	856,150	13,788	<0,001	1,632	70,556	<0,001	0,389	53,831	<0,001
kierunek cięcia/typ decelularyzacji	1278,798	20,594	<0,001	0,427	18,461	<0,001	0,035	4,833	0,030
kierunek cięcia/stężenie GA	146,602	2,361	0,074	0,390	16,852	<0,001	0,074	10,305	<0,001
typ decelularyzacji/stężenie GA	6,874	0,111	0,954	0,065	2,829	0,041	0,001	0,080	0,971
kierunek cięcia/typ decelularyzacji/stężenie GA	8,198	0,132	0,941	0,055	2,386	0,072	0,007	1,030	0,382

Zmienna grupująca	Energia w punkcie maksymalnego naprężenia			Wytrzymałość na rozciąganie			Naprężenie zrywające		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
kierunek cięcia	501360,836	1005,890	<0,001	4,987	456,962	<0,001	1,567	1759,832	<0,001
typ decelularyzacji	66726,125	133,874	<0,001	0,517	47,400	<0,001	0,074	83,290	<0,001
stężenie GA	35125,536	70,473	<0,001	0,181	16,568	<0,001	0,103	115,640	<0,001
kierunek cięcia/typ decelularyzacji	14228,239	28,546	<0,001	0,021	1,962	0,164	0,057	64,371	<0,001
kierunek cięcia/stężenie GA	13564,206	27,214	<0,001	0,051	4,647	0,004	0,063	70,942	<0,001
typ decelularyzacji/stężenie GA	4029,847	8,085	<0,001	0,014	1,303	0,276	0,029	32,247	<0,001
kierunek cięcia/typ decelularyzacji/stężenie GA	1438,155	2,885	0,038	0,010	0,905	0,441	0,029	32,392	<0,001

Tab. 4-2 Wyniki analizy wariancji zmian wartości parametrów opisujących wybrane właściwości biomechaniczne decelularnych i modyfikowanych GA tkanek płatków zastawki płucnej

Zmienna grupująca	Wydłużenie względne w punkcie maksymalnego naprężenia			Moduł elastyczności (MY)			Moduł ścieżny (Ms)		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
kierunek cicia	44,034	5,932	0,016	5148,643	2990,529	<0,001	441,311	1828,471	<0,001
typ decelularyzacji	11,946	1,609	0,207	790,844	459,353	<0,001	25,239	104,571	<0,001
stężenie GA	199,359	26,856	<0,001	240,593	139,746	<0,001	8,627	35,745	<0,001
kierunek cicia/typ decelularyzacji	21,832	2,941	0,089	710,306	412,573	<0,001	0,038	0,159	0,690
kierunek cicia/stężenie GA	11,375	1,532	0,210	172,344	100,104	<0,001	2,243	9,294	<0,001
typ decelularyzacji/stężenie GA	69,345	9,342	<0,001	10,718	6,225	0,001	2,164	8,968	<0,001
kierunek cicia/typ decelularyzacji/stężenie GA	2,525	0,340	0,796	10,274	5,968	<0,001	1,599	6,625	<0,001

Zmienna grupująca	Energia w punkcie maksymalnego naprężenia			Wytrzymałość na rozciąganie			Naprężenie zrywające		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
kierunek cicia	298,239	1198,464	<0,001	135,036	1159,621	<0,001	93,472	1275,746	<0,001
typ decelularyzacji	47,594	191,253	<0,001	24,125	207,171	<0,001	0,581	7,927	0,006
stężenie GA	17,829	71,647	<0,001	1,904	16,346	<0,001	2,249	30,696	<0,001
kierunek cicia/typ decelularyzacji	18,445	74,120	<0,001	21,813	187,317	<0,001	0,555	7,577	0,007
kierunek cicia/stężenie GA	6,095	24,493	<0,001	1,487	12,768	<0,001	1,922	26,231	<0,001
typ decelularyzacji/stężenie GA	2,125	8,541	<0,001	0,446	3,831	0,012	0,014	0,191	0,902
kierunek cicia/typ decelularyzacji/stężenie GA	0,562	2,257	0,085	0,508	4,365	0,006	0,032	0,432	0,731

Dla płatków zastawki płucnej wszystkie wyróżnione zmienne grupujące, działające jako czynniki pojedyncze i w kombinacjach, wpływały na występowanie istotnych różnic między grupami w przypadku takich parametrów jak: moduł elastyczności (MY) i wytrzymałość na rozciąganie z przeważającym wpływem kierunku cięcia tkanki. Największy efekt kierunku cięcia tkanki zanotowano również dla zmian modułu ścieżnego oraz energii w punkcie maksymalnego naprężenia i wartości naprężenia w momencie zerwania próbki. Wielkość wydłużenia względnego w badanych grupach doświadczalnych zależała głównie od stężenia GA.

5 DYSKUSJA

5.1 Wpływu decelularyzacji tkanki oraz sieciowania aldehydem glutarowym na jej strukturę ECM i właściwości mechaniczne

Inżynieria tkankowa od lat 80 tych jest prężnie rozwijającą się dziedziną wiedzy, która zyskuje na znaczeniu w projektowaniu nowych protez zastawek serca. Bioproteza zastawki serca, na którą w warunkach *in vivo* będą oddziaływać siły ścinające i naprężające, a ilość cykli pracy w ciągu dnia wyniesie w przybliżeniu 100 000 powinna posiadać niezbędną wytrzymałość mechaniczną oraz mechanizmy potrzebne do przeciwdziałania zmęczeniu struktur, z których jest zbudowana (Ibrahim i wsp. 2017). Do badań wykonanych w niniejszej pracy wykorzystano świnię zastawki płucne, które budową i rozmiarem są zbliżone do ludzkich, dzięki temu po odpowiedniej modyfikacji z powodzeniem mogą być wykorzystywane jako biologiczne protezy, co jest praktykowane przez klinicystów (Kheradvar i wsp., 2017). Ideą przyświecającą inżynierii tkankowej jest stworzenie biokompatybilnego, zdolnego do przebudowy „żywego” konstruktu, który w pełni zastąpi niewydolną tkankę lub narząd (Berthiaume i wsp. 2011; Maxfield i wsp., 2013). Podążając za tą koncepcją, aby ograniczyć potencjalną reakcję immunologiczną organizmu, zastawki świnię w niniejszych badaniach poddano procesom usuwania komórek i konserwacji chemicznej aldehydem glutarowym. Na podstawie literatury i wieloletniego doświadczenia zespołu badawczego Pracowni Bioinżynierii w Fundacji Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi, wyselekcjonowano dwie metody ekstrakcji komórek z tkanki. Jednym z celów badawczych było zatem określenie efektywności usuwania komórek z tkanki oraz wpływu zastosowanych metod na zachowanie struktur ECM. Analiza histologiczna tkanek barwionych HE wykazała, iż metoda D2 (detergentowa), w porównaniu do metody D1 (enzymatycznej), była skuteczniejsza w usuwaniu komórek z tkanki. W decelularyzacji metodą D1 użyto roztworu 1% trypsyny z 0,05% EDTA, które były głównymi czynnikami degradującymi komórki, oraz roztwór 0,5% SDS zastosowany w celu wypłukania reszt komórkowych z rusztowania. Trypsyna, należy do enzymów z grupy endopeptydaz, katalizuje hydrolizę wiązań peptydowych w miejscach, w których grupy karbonylowe należą do argininy lub lizyny. Jej skuteczność w usuwaniu komórek z tkanek samodzielnie lub w połączeniu z detergentami wykazało wielu badaczy. Walles i wsp. (2003) do usuwania komórek z owczej aorty zastosowali 0,1% roztwór trypsyny w PBS, w którym inkubowano tkankę przez 48 h w 37 °C w warunkach ciągłego wytrząsania. Osiągnęli oni całkowicie decelularną matrycę z dobrze zachowaną macierzą zewnątrzkomórkową, gdzie zawartość kolagenu, elastyny i GAG nie odbiegała od ilości zmierzonej dla tkanki natywnej. Grabow i wsp. (2004) również potwierdzili brak komórek w uzyskanych rusztowaniach świnięj

zastawki aortalnej stosując 0,05% roztwór trypsyny z EDTA przez 48 h. Z kolei Schenke-Layland z zespołem (2003) wykorzystując 0,05% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA, którym traktowali świńskie zastawki płucne przez 5 h, 8 h lub 24 h wykazali, iż czas 24 h był najefektywniejszy w usuwaniu komórek z tkanki bez znaczącego wpływu na strukturę ECM. W rusztowaniach jednak wciąż widoczne były reszty jąder komórkowych, co świadczy o ograniczeniach tej metody. Roosens i wsp. (2016) z spośród trzech badanych przez siebie metod decelularyzacji świńskich zastawek aortalnych, wyselekcjonowali jako najskuteczniejszą połączenie mieszanin 1% tritonu X-100, RNAzy, i DNAzy oraz 0,01% trypsyny, którymi tkanka była traktowana na różnych etapach procesu usuwania komórek. Przewagę metod detergentowych nad enzymatycznymi natomiast potwierdzili w swoich badaniach Zhou i wsp. (2010). Porównywali oni 4 metody decelularyzacji, gdzie świńskie zastawki płucne poddane były działaniu: A - 1% roztworu deoksycholanu sodu (24 h); B - 1% roztworu SDS (24 h); C - 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA (24 h) lub D - gdzie zastosowano 0,1% trypsyny z 0,02% EDTA (1 h), roztwory hipotoniczny i hipertoniczny buforu Tris w połączeniu z PMSF lub Triton X-100 (każdy po 4 h), oraz roztwór DNAzy i RNAzy (4 h) zakończony procesem płukania w hipertonicznym roztworze Tris. W badaniu struktury ECM z użyciem dwu-fotonowego mikroskopu skaningowego wykazano, iż tylko metoda z użyciem deoksycholanu sodu (grupa A) prawie całkowicie zachowała prawidłową strukturę kolagenu i elastyny. W płatkach traktowanych SDS (grupa B) włókna elastynowe przyjęły zwartą i pofałdowaną strukturę, włókna kolagenowe z kolei wykazywały utratę szczegółów struktury. W płatkach po zastosowaniu trypsyny/EDTA (grupa C) zaobserwowano znacznie mniej włókien sprężystych. Podobne zmiany wykazano w przypadku włókien kolagenowych, które były bardziej rozluźnione niż w grupie natywnej. W grupie D, traktowanej trypsyną/EDTA i tritonem X-100, włókna sprężyste pozostały nienaruszone, jednak włókna kolagenu straciły swoją falistą strukturę i przyjmowały nieprawidłowe ułożenie.

W badaniach niniejszej pracy, porównanie metody D1 do D2 również wykazało zauważalne zmiany w morfologii i barwliwości włókien kolagenowych na korzyść metody z użyciem deoksycholanu sodu (D2). Także morfologia włókien elastynowych w przypadku metody D2 była bardziej zbliżona do tkanki natywnej niż D1, choć nie wykazano tu różnic w stopniu ich zabarwienia, a tylko w stopniu upakowania tych włókien. Może być to konsekwencją częściowej ich degradacji tak jak to zauważył zespół Zhou w swojej pracy wspomnianej powyżej. Choć układ włókien rusztowań po decelularyzacji metodą D2 był bardziej uporządkowany i spójny niż po decelularyzacji metodą D1 to zauważono tu znaczny spadek zawartości glikozaminoglikanów. Zarówno detergenty jak i enzymy mogą prowadzić do utraty GAG z tkanki. Potwierdzenie tych obserwacji dla metody enzymatycznej znalazły

badania Schenke-Layland i wsp. (2003). Z kolei Poornejad i wsp. (2016) porównując metody decelularyzacji tkanek nerki z użyciem między innymi trypsyny, SDS lub Tritonu X-100, największe straty GAG zanotowali dla trypsyny i SDS, przy dobrym zachowaniu GAG w przypadku zastosowania Tritonu X – 100. Również zespół Faulk (2014), który testował różne metody decelularyzacji tkanek pęcherza moczowego wykazał po 24 h inkubacji z danym roztworem porównywalną do grupy kontrolnej retencję GAG dla 3% roztworu tritonu X-100 oraz 4% deoksycholenu sodu przy znacznej degradacji GAG dla 1% roztwór SDS.

Zaskakująca jest więc utrata GAG zaobserwowana w niniejszych badaniach dla tkanek poddanych metodzie D2. Długotrwałe użycie detergentów w metodzie D2 spowodowało w tym przypadku bardziej widoczne wypłukanie GAG z tkanki co było mniej zauważalne w przypadku użycia enzymu w metodzie D1. Na stopień wypłukania GAG z tkanki ma wpływ rodzaj użytego środka, jego stężenie, czas oraz typ tkanki. Należałoby zatem zrewidować poszczególne parametry dla optymalizacji metody D2 lub zastosować środki, które pozwoliłyby na utrzymanie GAG w tkance. Istnieją doniesienia, że wcześniejsza inkubacja tkanki z tiosiarczanem neomycyny poprawia retencję GAG w tkance (Shah i Vyavahare, 2008). Brak GAG bowiem może nieść dla rusztowania poważne konsekwencje, gdyż ich usunięcie może być jednym z kluczowych czynników zmniejszających uwodnienie środowiska tkanki. Samo uwodnienie jest niezwykle istotne ponieważ jest ono niezbędne do pochłaniania obciążeń na ściskanie, modulowania naprężeń ścinających i zmniejszających tarcie pomiędzy warstwą włóknistą, a komorową w trakcie intensywnej pracy zastawki. Oprócz tego biologiczna charakterystyka GAG obejmuje wiązanie i modulację czynników wzrostu, hamowanie aktywności proteaz i udział w adhezji, migracji, proliferacji i różnicowaniu komórek (Flanagan i wsp. 2006). Z kolei polisacharydy występujące na powierzchni tkanki zapobiegają powstawaniu skrzepów krwi oraz biorą udział w regulacji procesów wzrostu komórek i interakcji komórka – komórka (Lennon i Singleton, 2011; Ghatak i wsp. 2015). W perspektywie dalszych badań stosownym rozwiązaniem wydaje się więc użycie naturalnych polisacharydów takich jak heparyna, siarczan heparanu, siarczan chondroityny czy kwas hialuronowy do modyfikacji tkanki. Interesujące ze względu na podobieństwo budowy do heparyny, działanie przeciwzapalne i dobrą biokompatybilność jest wykorzystanie fukoidanu - naturalnego polisacharydu ekstrahowanego z alg, którego użycie niesie niższe prawdopodobieństwo powikłań krwotocznych niż heparyna, a jego działanie może dodatkowo polepszyć adhezję komórek do powierzchni kolagenowej matrycy (Marinval i wsp. 2018).

Istotnym aspektem trwałości bioprotezy jest jej odporność na działanie enzymów proteolitycznych *in vivo*. Sieć włókien kolagenowych w strukturach zastawki odpowiada za jej sztywność i przeciwdziała nadmiernemu rozciągnięciu podczas jej pracy. Ważna jest zatem stabilizacja włókien kolagenowych. Sieciowanie ma za zadanie odtworzenie lub wzmocnienie wiązań kowalencyjnych między aminokwasami budującymi białkową strukturę kolagenu. Kolagenaza jest specyficznym enzymem uwalnianym przez komórki fagocytyczne i fibroblasty, które inicjują rozkład kolagenu (Kielty i Grant. 2002). Trwałość konstrukcji rusztowania jest niezbędna do utrzymania prawidłowej pracy bioprotezy, a zbyt gwałtowna biodegradacja powoduje utratę jej funkcjonalności. Przeprowadzone badania wykazały, iż nawet tak niskie stężenia aldehydu glutarowego jak 0,025% (GA2) i 0,05% (GA3), zabezpieczyły tkankę przed utratą kolagenu z naczyń i płatków zastawek płucnych w oddziaływaniu z kolagenazą. Najniższe użyte stężenie 0,0125% GA okazało się tu niewystarczające. Co ciekawe barwliwość preparatów tkankowych pochodzących z matryc zwiększała się wraz ze wzrostem użytego stężenia GA, świadczyć to może o lepszym stopniu sieciowania kolagenu w rusztowaniach. Wiązania, które podczas procesu decelularyzacji zostały naruszone uległy stabilizacji i wzmocnieniu co dało widoczny efekt przy ich barwieniu. Tedder i wsp. (2009) testując odporność na degradację decelularnych matryc perikardium oraz sieciowanych 0,6% GA lub PGG (1,2,3,4,6-Penta-O-galloilo-beta-D-glukoza) zaobserwowali, iż brak stabilizacji skutkuje całkowitą degradacją decelularnych matryc w ciągu 1-2 dni podczas gdy rusztowania sieciowane PGG wykazywały ślady degradacji po 7 dniach. Grupa rusztowań traktowana GA okazała się natomiast odporna na degradację nawet po 7 dniach. Autorzy sugerują jednak, iż całkowita odporność na degradację może utrudnić, a nawet uniemożliwić późniejszą przebudowę tkanki. Zastosowanie niższego stężenia niż stosowanego komercyjnie (0,6%) powinno zatem ograniczyć efektywność sieciowania i pozwolić na powolną przebudowę tkanki. Roe z zespołem (1990) do stabilizacji kolagenu w ścięgnach użyli siedmiu różnych stężeń GA (0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,075%; 0,1%; 0,25%; 0,5%). Wykazali, że stężenia 0,01% - 0,075% pozwoliły na wolniejszą degradację implantu od tych niesieciowanych GA, a dodatkowo stężenia te pozwoliły na infiltrację komórek do wnętrza implantów po 12 tygodniach od ich wszczepienia królikom, czego nie zaobserwowano przy zastosowaniu stężeń $\geq 0,1\%$.

Kluczowym aspektem prawidłowej funkcji zastawki i jej długoletniej trwałości jest jej odporność na proces kalcyfikacji. Obecnie jest to jedna z najczęstszych przyczyn degeneracji komercyjnie dostępnych bioprotez, która stanowi istotny problem zwłaszcza u młodych i pediatrycznych pacjentów. Jak już opisano w rozdziale 1.10 przyczyna odkładania wapnia w bioprotezach jest złożona i nadal nie w pełni poznana, wiadomo jednak, iż układ

immunologiczny pełni tu ważną rolę. Powstawanie miejscowych reakcji zapalnych w związku z obecnością martwych komórek w tkance działa jak katalizator dla procesu kalcyfikacji. Również sam aldehyd glutarowy jest na liście głównych czynników powodujących wapnienie tkanki. W literaturze na temat tego czy niskie stężenia aldehydu glutarowego wzmagają czy obniżają prawdopodobieństwo kalcyfikacji tkanki można znaleźć niejednoznaczne doniesienia. Zilla i wsp. (1997) do sieciowania fragmentów aorty zastosowali stężenia 0,2%; 1% oraz 3%. Implanty zostały wszczepione podskórnemu szczurom na czas 12 tygodni oraz pawianom donaczyniowo na okres 6 tygodni. W obu modelach zwierzęcych zaobserwowano, że traktowanie tkanek niskimi stężeniami GA nie minimalizuje ich wapnienia, a wręcz przeciwnie – niższy stopień zwapnienia osiągany jest przy wyższych stężeniach. Podobne tendencje zauważyli Lee i wsp. (2017), którzy testowali stężenia 0,3%; 0,4%, 0,5% i 0,6% GA na wołowym osierdziu wszczepianym podskórnemu szczurom na okres 2 miesięcy. Najniższy stopień zwapnienia osiągnięto dla stężeń 0,5% oraz 0,6%. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, iż oba zespoły wykorzystywały tkanki natywne. Badania Lim i wsp. (2012) wykazały bowiem, iż pozbawienie tkanki komórek istotnie zmniejsza ilość ognisk wapnia, przy porównaniu tkanki natywnej sieciowanej 0,5% GA z tkanką decelularną traktowaną tym samym stężeniem GA. Zespół testując różne grupy badawcze zauważył również, że inkubacja w rozpuszczalnikach organicznych takich jak etanol i oktanol (w stężeniach odpowiednio 70 - 75% i 5 - 10%) dodatkowo minimalizuje efekt kalcyfikacji decelularnych rusztowań. Neethling i wsp. (2014) z kolei porównywali wołowe perikardium (BP – ang. bovine pericardium) z ludzkim (HP – ang. human pericardium). Badacze podzielili tkanki na 4 grupy: grupa 1: BP sieciowane 0,625% GA; grupa 2: HP sieciowane 0,0625% GA; grupa 3: HP decelularne sieciowane 0,05% GA traktowane etanolem oraz grupa 4: BP decelularne sieciowane 0,05% GA traktowane etanolem. Najlepsze rezultaty po 8 i 16 tygodniach podskórnego wszczepionego implantu szczurom, osiągnięto dla grupy 3 i 4, dla których zawartość wapnia w tkance była minimalna w porównaniu do grup 1 i 2. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, decelularne matryce traktowane niskimi stężeniami aldehydu glutarowego powinny więc wykazywać niższą podatność na proces kalcyfikacji.

Z przeprowadzonych badań niniejszej pracy wynika, iż zastosowanie nawet niskich stężeń GA nie zapobiegło kalcyfikacji naczyń. Na uwagę zasługuje fakt, iż tkanki natywne naczyń charakteryzowały się tym samym poziomem zwapnienia niezależnie od użytego stężenia, natomiast wzrost stopnia kalcyfikacji skorelowany ze stężeniem GA zaobserwowano dla tkanek decelularnych. Naruszenie struktur ECM podczas decelularyzacji oraz powstanie wolnych przestrzeni w miejscach zajmowanych uprzednio przez komórki, mogło doprowadzić do większej penetracji środka sieciującego, co utrudniło jego dokładne

wypłukanie z rusztowania. Stężenie GA zatem odegrało tu większą rolę niż w przypadku tkanek natywnych. Struktura tkanki natywnej nie była naruszona więc jej stopień sieciowania użytymi stężeniami GA, był prawdopodobnie porównywalny i nie odgrywał tu tak znaczącej roli jak w przypadku otrzymanych rusztowań. Decelularyzacja D2 ponownie okazała się być lepsza od D1 pod względem badanego parametru. Degradacja i rozluźnienie macierzy zewnątrzkomórkowej miało tu więc konsekwencję w stopniu kalcyfikacji matrycy. Dodatkowo jak już wcześniej zauważono metoda D1 nie eliminowała w pełni komórek z rusztowania co jest kolejnym czynnikiem wzmagającym wapnienie. W przypadku natywnych płatków wykazano podobne rezultaty jak dla badanych naczyń. Interesujące wydaje się, iż stopień zwapnienia dla decelularnych matryc D1p był niższy od płatków natywnych (Np) natomiast na matrycach płatków D2p nie wykazano złogów wapnia (Ryc. 4-10). Płatki zastawki płucnej są znacznie cieńsze od naczyń, co znacznie ułatwia wymywanie pozostałości GA z tkanki. Mniejsza ingerencja w struktury ECM matrycy po decelularyzacji D2 niż D1, przy lepszej efektywności usuwania komórek z tkanki również spowodowała obniżenie kalcyfikacji. Wydaje się także, że w przypadku płatków zastawki płucnej, brak komórek świńskich odegrał kluczową rolę w prewencji odkładania wapnia, a sam aldehyd glutarowy nie był tu jedynym decydującym o tym procesie czynnikiem. Ograniczeniem przedstawionego badania *in vitro*, jest brak kontaktu modyfikowanego rusztowania z układem immunologicznym organizmu. Należy również dodać, iż wtórne zasiedlenie rusztowania komórkami potencjalnego biorcy, które byłyby w pełni funkcjonalne, miałyoby być głównym czynnikiem zabezpieczającym przed odkładaniem wapnia w tkance. Eksperyment oceny kalcyfikacji *in vitro* jest badaniem, uniemożliwiającym przeprowadzenie go z zachowaniem zasiedlonych żywych komórek śródbłonna. Istnieje zatem potrzeba przetestowania tego modelu w warunkach *in vivo*, co pozwoliłoby zaobserwować więcej zależności pomiędzy zastosowanymi czynnikami do modyfikacji tkanki, a reakcją żywego organizmu.

Bezpośrednim odzwierciedleniem morfologii tkanki są jej właściwości biomechaniczne. Badanie wytrzymałości bioprotez jest zatem niezbędnym elementem w ocenie przydatności takiej tkanki do wszczepienia. Projektując bioprotezę należy pamiętać o zmienności osobniczej, która wpływa na właściwości i otrzymane wyniki dla danego parametru. Wiadomo również iż zastawki serca pochodzenia odzwierzęcego są zazwyczaj mniej wytrzymałe, w porównaniu do ludzkich co jest jednym z powodów dlaczego wszczepiane ksenografty nie zapewniają wystarczającej wytrzymałości w przypadku zastosowania ich u ludzi (Hasan i wsp. 2014). Zarówno ściana tętnicy jak i sam płatek posiada budowę wielowarstwową o wysokim stopniu skomplikowania struktur wewnętrznych, co warunkuje właściwości anizotropowe tych tkanek. Podczas

odkształcenia dochodzi do rozciągnięcia włókien sprężystych i wyprostowania włókien kolagenowych. Profil krzywej naprężenia od odkształcenia (przykład Ryc. 3-9) w przeprowadzonych badaniach miał charakter nieliniowy, co jest typowe dla tkanek miękkich o budowie anizotropowej. Wykonane testy jednoosiowego rozciągania tkanki wykazały, iż proces usuwania komórek z tkanki naczyń i płatków nie pozostał obojętny dla wytrzymałości mechanicznej otrzymanych rusztowań. Odnotowany wzrost odkształcenia względnego zaobserwowany zwłaszcza w przypadku metody D1 wiąże się prawdopodobnie z powstawaniem przestrzeni, które wcześniej zajmowały komórki. Spowodowało to rozluźnienie struktury i umożliwiło większe rozciągnięcie rusztowań niż tkanki natywnej. Naczynie tętnicze składa się bowiem z trzech warstw, spośród których największy wpływ na właściwości mechaniczne ma błona wewnętrzna (łac. media) (Schoen, 2016). Przeważającymi składnikami tej warstwy są komórki mięśniowe oraz włókna elastynowe, oprócz nich w jej skład wchodzi proteoglikany i kolagen typu I, III i V. Włókna kolagenowe ułożone obwodowo znajdują się pomiędzy komórkami mięśni gładkich, które odpowiadają za przenoszenie sił pomiędzy komórkami, a włóknami elastynowymi (Manji i wsp. 2015). W przypadku płatków również mamy do czynienia z trójwarstwową strukturą, z których *fibrosa* jest najgrubsza i składa się głównie z włókien kolagenowych typu I ułożonych obwodowo, pomiędzy którymi znajdują się komórki interstycjalne. Funkcjonalnie jest to najbardziej wytrzymała na obciążenia warstwa płatka (Sacks i wsp. 2009). Komórki w tych kluczowych dla wytrzymałości mechanicznej warstwach ułożone obwodowo mają znaczący wpływ na sztywność obu tkanek. Utrata tych komórek powoduje, iż wartość modułów elastyczności spada, w porównaniu z tkanką natywną, a ciągliwość rusztowania tkankowego wzrasta. Wiadomo, iż im wyższa wartość modułu elastyczności tym materiał jest sztywniejszy, spadek modułu elastyczności po decelularyzacji świadczy o zwiększeniu jej podatności na odkształcenie (Ethier i Simmons, 2007).

Podobne obserwacje, jak w prezentowanej pracy po procesie decelularyzacji zaobserwowali Korossis i wsp. (2002), którzy porównywali wytrzymałość na rozciąganie natywnych płatków zastawki aortalnej poddanych działaniu 0,03% lub 0,1% SDS. Zaobserwowali oni istotne różnice między zdolnością do odkształcenia tkanek natywnych, a tkanek poddanych decelularyzacji. Decelularne płatki charakteryzowały się zwiększoną podatnością na odkształcenie i obniżoną wartością modułu elastyczności, co było widoczne zwłaszcza w próbach badanych w kierunku obwodowym. Tudorache i wsp. (2007) porównywali wpływ różnych metod decelularyzacji świńskiej zastawki płucnej na właściwości biomechaniczne otrzymanych rusztowań. Do usuwania komórek z tkanki stosowali A – 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA (48 h); B – 1% roztwór SDS (24 h) lub C – 1%

roztwór deoksyholanu sodu (24 h). Testy biomechaniczne na fragmentach naczyń potwierdziły tendencję wzrostową dla odkształcenia tkanki po jej decelularyzacji z równoczesnym spadkiem wartości modułu elastyczności, energii w maksymalnym punkcie naprężenia i naprężenia zrywającego, aczkolwiek istotne różnice zanotowano tu tylko dla grupy A. Zespół również potwierdził, iż stosowanie trypsyny z EDTA do usuwania komórek miało negatywny wpływ na strukturę tkanki, które spowodowało większe jej zniszczenia objawiające się maceracją, obrzękiem i niejednorodnością ECM. Dodatkowo badacze zaobserwowali, iż tylko zastosowane przez nich metody detergentowe w pełni poradziły sobie z usunięciem komórek z płatków i naczyń zastawki podczas gdy w rusztowaniach po użyciu trypsyny wciąż można było zauważyć komórki.

W przedstawionych badaniach w przypadku tkanek decelularnych właściwości biomechaniczne rusztowania zmieniły się istotnie zarówno dla naczyń jak i płatków. Niemniej jednak decelularyzacja D2 okazała się metodą, która mniej agresywnie ingeruje w struktury tkanki. Na zwiększenie stopnia odkształcenia względnego i obniżenie wartości pozostałych badanych parametrów niewątpliwie miał wpływ stopień degradacji matrycy i rozluźnienie struktury włókien kolagenowych. Sieciowanie aldehydem glutarowym dało widoczny efekt i poprawę wszystkich badanych parametrów, zarówno dla naczyń jak i płatków, co było skorelowane z użytym stężeniem GA. Aldehyd glutarowy dzięki swojej polimerowej naturze może tworzyć wiązania o zróżnicowanej długości, dzięki temu wolne grupy aminowe, które są oddalone od siebie w różnej odległości stanowią potencjalne miejsce wiązania dla GA (Charulatha i Rajaram, 2003). Ponieważ zastosowane w prezentowanej pracy stężenia są bardzo niskie prawdopodobnie nie nastąpiła rozległa polimeryzacja GA, co zminimalizowało ilość tworzonych polimerów o dużym zasięgu. W konsekwencji dostępna była mniejsza ilość wolnych grup aminowych pomiędzy, którymi mogło powstać wiązanie. Teoria ta tłumaczy tendencję wzrostową poprawy parametrów biomechanicznych wraz ze wzrostem stężenia użytego GA (Charulatha i Rajaram, 2003).

Najlepsze rezultaty w poprawie właściwości biomechanicznych rusztowań naczyń i płatków osiągnięto dla rusztowań po decelularyzacji metodą D2 traktowanych stężeniami 0,025% GA oraz 0,05% GA. Matryce D2nGA3 i D2pGA3 natomiast posiadały najbliższy tkance natywnej profil właściwości mechanicznych. Równoległy wzrost wartości modułu elastyczności, wytrzymałości na rozciąganie i naprężenia zrywającego świadczy o tym, iż sieciowanie usztywniło matrycę, przy zachowaniu zbliżonej elastyczności do tkanki natywnej. Zbyt silne sieciowanie tkanki bowiem może spowodować, iż tkanka pomimo większej sztywności stanie się bardziej krucha i bardziej podatna na uszkodzenia (Zhai i wsp. 2006). W przypadku decelularyzacji metodą D1 zmiany w strukturach tkanki okazały

się nieodwracalne, a użycie niskich stężeń GA niewystarczające do osiągnięcia właściwości z przed decelularyzacji. Zaobserwowano jednak, iż wzrost wytrzymałości mechanicznej rusztowań wzrasta wraz ze wzrostem stężenia użytego GA. Choć nie były to wartości istotnie statystycznie, to najbliższe właściwościom biomechanicznym tkance natywnej były rusztowania traktowane najwyższym spośród badanych stężeń GA (0,05%).

5.2 Zdolność zasiedlania komórkami śródbłónka decelularnych rusztowań modyfikowanych GA

W celu osiągnięcia pełnej funkcjonalności bioproteza powinna posiadać zdolność do regeneracji i przebudowy. Niezbędnym elementem, który zapewniłby tę możliwość są żywe, proliferujące komórki, posiadające zdolność do produkcji elementów ECM. Projektując bioprotezę należy więc sprawdzić jej biokompatybilność oraz zdolność do zasiedlania komórkowego. Częstym modelem w przypadku protez zastawek serca są komórki śródbłónka, które w naturalnej zdrowej zastawce są odpowiedzialne za homeostazę i zapewnienie atrombogennej powierzchni. W niniejszej pracy wykazano, iż wszystkie rusztowania płatków i naczyń, zarówno otrzymane metodą D1 jak i D2, udało się zasiedlić komórkami HUVEC. Zgodnie ze standardami ISO 1993 – 5 procent komórek martwych lub o nieprawidłowej budowie w granicy od 20% - 50% wskazuje na niewielką do średniej toksyczności użytego czynnika. Wynik 18%, który był zbliżony do dolnej granicy cytotoksyczności osiągnięto tylko w przypadku płatków po decelularyzacji D1 modyfikowanych GA3, dla pozostałych matryc procent komórek martwych był niższy. Jak można było przypuszczać, stężenie aldehydu glutarowego miało wpływ na wzrost śmiertelności komórek na zasiedlanych matrycach. Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż wszystkie decelularne matryce otrzymane metodą D1 posiadały większy odsetek komórek martwych, w porównaniu do matryc po D2. Wydaje się więc, że decydującą rolę w przeżywalności komórek odgrywała tu metoda decelularyzacji, skorelowana ze stężeniem aldehydu glutarowego. Powodem tego może być również sama morfologia matrycy, która w przypadku D1 była bardziej zdegradowana od matryc po D2. Wiadomo, iż zachowanie komórek jest między innymi regulowane przez interakcje komórka – ECM. Białka ECM wchodząc w interakcję z receptorami błonowymi komórki inicjują odpowiednią ścieżkę sygnałową, która może prowadzić komórki na ścieżkę proliferacji, różnicowania czy apoptozy. Kondycja ECM ma zatem wpływ na adhezję komórek do podłoża i może decydować o przeżywalności komórek (Latif i wsp. 2005). Istnieją dane wskazujące, że substancje stosowane do usuwania komórek są trudne do usunięcia i mogą powodować cytotoksyczność (Xu i wsp. 2007; Kawecki i wsp. 2018). Zespół White'a (2017) do usunięcia komórek z pęcherza moczowego świni domowej zastosował między innymi 3% roztwór

Triton X-100, 4% roztwór deoksycholanu sodu lub 1% roztwór SDS. Rusztowania otrzymane przy pomocy tritonu oraz deoksycholanu sodu zachowały swoją prawidłową sieć włókien, natomiast użycie SDS spowodowało pojawienie się amorficznej, bez wyszczególnionych pojedynczych włókien, struktury. Zasiedlanie rusztowań komórkami wykazało również, iż żywotność, fenotyp i zdolność do proliferacji była utrzymana na tym samym poziomie co w próbach kontrolnych, tylko na rusztowaniach otrzymanych przy użyciu deoksycholanu sodu lub Tritonu X-100. Komórki endotelialne zasiedlające rusztowania po SDS posiadały natomiast mniejszą konfluencję. Badania dotyczące potencjalnej toksyczności SDS przeprowadzili Gratzner i wsp. (2006), którzy do eksperymentu użyli decelularnych przy pomocy SDS wiązań krzyżowych, które wtórnie zasiedlali fibroblastami. Choć zmierzone stężenie SDS w ich próbkach było od 8 do 23 razy mniejsze od stężenia uznawanego za limit cytotoksyczności tej substancji, to repopulacja rusztowań komórkami wciąż była utrudniona. Autorzy wywnioskowali, iż SDS prowadzi do nieodwracalnych zmian biochemicznych i strukturalnych ECM, które utrudniają poprawną adhezję komórek. Powyższe badania mogą zatem tłumaczyć synergistyczny efekt działania stężenia aldehydu glutarowego, który nałożył się z negatywnymi skutkami spowodowanymi przez decelularyzację metodą D1.

W badaniu odpowiedzi komórek pod wpływem ekstraktów zanotowano także, iż toksyczność ekstraktu rosła wraz ze stężeniem GA użytego do modyfikacji tkanki i dla obu typów decelularyzacji największy odsetek komórek martwych i apoptotycznych zanotowano dla stężenia 0,05%. Suma komórek martwych i apoptotycznych dla E1GA3 wynosiła 32,6% natomiast dla E2GA3 26,9%. Wartości te wskazują więc na umiarkowaną cytotoksyczność użytego stężenia GA (zgodnie z normą ISO 1993 – 5). Podobnie jak przy bezpośrednim zasiedlaniu matrycy zaobserwowano, iż liczba komórek żywych traktowanych ekstraktami otrzymanymi z tkanek po decelularyzacji metodą D1 była zawsze niższa od tych po zastosowaniu metody D2, co potwierdza teorię, że metoda decelularyzacji odegrała znaczną rolę w przeżywalności komórek śródbłonna. Oznaczać to może, że w przypadku metody D1 trypsyna wraz z użytym SDS faktycznie nie uległy w pełni wypłukiwaniu podczas procesu przygotowywania rusztowań, co wzmacniało efekt cytotoksyczności otrzymanego ekstraktu.

Aktywność komórki i jej odpowiedź na bodźce ze środowiska zewnętrznego ma bezpośredni efekt na strukturę cytoszkieletu komórkowego. Mikrofilamenty aktynowe, mikrotubule i filamenty pośrednie są w stałej, ścisłej komunikacji ze sobą i są głównymi wyznacznikami kształtu komórki (Revenu i wsp. 2004). Cytoszkielet aktynowy to strukturalna sieć białek, które są niezbędne dla wielu funkcji biologicznych komórki, w tym

organizacji wewnętrznej, cytokinezy, endocytozy i apoptozy (Desouza i wsp. 2012). Filamenty aktyny biorą udział w kontrolowaniu kształtu komórki, migracji, adhezji komórka-substrat, komórka-komórka oraz endo- i egzocytozy, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. W śródbłonku spoczynkowym i hodowli konfluentnej aktyna tworzy obrzeże korowe, które oddziałuje zarówno z cząsteczkami adhezyjnymi między sąsiadującymi komórkami, jak i cząsteczkami adhezyjnymi macierzy zewnątrzkomórkowej (Revenu i wsp. 2004; Prasain i wsp. 2009). W eksperymencie, w którym zastosowano ekstrakty tkankowe, elementy te zaobserwowano tylko w przypadku grupy kontrolnej (K), co sugeruje ich stan zbliżony do spoczynkowego. Świadczyć to może o szybszym osiągnięciu przez tą grupę, w odróżnieniu od reszty badanych komórek, pełnej konfluencji. W pozostałych grupach, za wyjątkiem E1GA3, zanotowano obecność aktynowych włókien naprężeniowych. Taka morfologia może być następstwem migracji tych komórek, co ma miejsce w hodowli subkonfluentnej lub aktywacji komórek śródbłonka będącej następstwem gojenia ran i występowaniem stanów zapalnych (Millán i wsp. 2010). Uznawane jest również, że obecność włókien stresowych może pełnić funkcję ochronną, ponieważ zwiększają one wytrzymałość całej komórki, a także mogą ułatwiać przejściową adhezję komórek do podłoża przez oddziaływanie z cząsteczkami adhezyjnymi (Tojkander i wsp. 2011). Niepożądany jest więc stan, który zaobserwowano w grupie E1GA3, w której obecność filamentów aktynowych była znikoma lub zaobserwowano ich brak. Komórki te zatem wykazywały stan patologiczny, co może wpływać na ich adhezję do podłoża, a w konsekwencji prowadzić do ich śmierci. Znajduje to swoje potwierdzenie w znacznym procencie komórek martwych i apoptotycznych w badaniu cytometrycznym. W grupie komórek traktowanych ekstraktami pochodzącymi z tkanek po decelularyzacji metodą D1 wraz z rosnącym stężeniem GA zanotowano obkurczenie się cytoplazmy, co ciekawe w grupie ekstraktów po decelularyzacji metodą D2 efekt ten był znikomy i zauważalny tylko w grupie E2GA3. Podobnie więc jak w przypadku bezpośredniego zasiedlania matrycy stężenie GA nie było tu decydującym czynnikiem wpływającym na stan badanych komórek. Można wnioskować zatem, iż substancje stosowane do decelularyzacji tkanki metodą D1 w sposób synergiczny wraz z zastosowanym stężeniem GA oddziaływały na stan komórki.

Rola filamentów pośrednich w regulacji funkcji komórek śródbłonka nie jest jeszcze wystarczająco zbadana, wiadomo jednak, że wpływają one na właściwości biomechaniczne komórki, ruch, adhezję, a także przepuszczalność śródbłonka. Komórki z grupy kontrolnej oraz traktowane ekstraktem E2 wykazywały równomierne rozmieszczenie wimentyny podczas gdy w pozostałych komórkach obserwowano przemieszczenie się wimentyny w pobliże jądra komórkowego. Podobny efekt zaobserwował zespół Liu (2010), którzy badali efekt hipoksji na szczurzych komórkach śródbłonka. Zaobserwowali oni po 30 minutach

inkubacji komórek w warunkach hipoksji rozmieszczenie wimentyny w obszarze perinuklearnym. Autorzy tego eksperymentu sugerują, że koncentracja filamentów pośrednich wokół jądra może ułatwiać komórce w jej obkurczeniu i wpływać na przepuszczalność bariery śródbłonna. Z innych doniesień wiadomo, że hipoksja zmienia właściwości przeciwzakrzepowe endotelium, wpływa na homeostazę i tonus naczyń krwionośnych. W perspektywie dalszych badań należałoby więc skupić uwagę na morfologii poszczególnych elementów cytoszkieletu zarówno na poziomie obserwacji mikroskopowych zmian zachodzących w komórce jak i na poziomie szlaków sygnałowych i ekspresji białek badanych metodami molekularnymi. Pozwoliłoby to określić w jakim stopniu zaobserwowany efekt w niniejszych badaniach był podobny do tych opisanych w powyższej literaturze.

Aby jeszcze dokładniej przyjrzeć się odpowiedzi komórkowej w kontakcie z modyfikowanymi rusztowaniami zmierzono poziom dwóch wybranych cytokin wydzielanych przez komórki traktowane ekstraktami tkankowymi. IL-6 jest wielofunkcyjną cytokiną rozpoznawaną przez różne komórki, w tym komórki śródbłonna. Choć IL-6 jest uważana głównie za cytokinę prozapalną, jest również zaangażowana w regulację procesów metabolicznych i regeneracyjnych (Scheller i wsp. 2011). IL-6 indukuje proliferację ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) *in vitro*, oraz modyfikuje morfologię i przepuszczalność śródbłonna. Loganadane i wsp. (1997), którzy badali wpływ cytokin na proliferację komórek śródbłonna oraz sekrecję trombospondyny – 1, wykazali 25% wzrost proliferacji HUVEC inkubowanych z IL-6 przy stężeniach $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i $20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Przy wyższym stężeniu ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), zaobserwowano natomiast spadek proliferacji o 23%, co wskazywało prawdopodobnie na efekt cytotoksyczny tej cytokiny. W przeprowadzonym w niniejszej pracy eksperymencie komórki traktowane ekstraktami E2 oraz E2GA1 wykazały obecność IL6 na poziomie bliskim lub nieprzekraczającym stężenia zanotowanego dla kontroli (Ryc. 4-17). Można więc przypuszczać, iż stężenie tej cytokiny świadczyło o proliferacji i aktywności komórek zbliżonej do próby kontrolnej. W przypadku pozostałych grup wykazano inhibicję wydzielanej cytokiny, co wiązało się prawdopodobnie ze spadkiem proliferacji komórkowej. Dodatkowo jak wykazały badania cytometryczne wraz ze wzrostem stężenia GA nastąpił wzrost liczby komórek martwych co przełożyło się na stężenie IL-6 w medium hodowlanym.

Autokrynnny efekt regulujący proliferację komórek śródbłonna opisano również dla IL-8 (Li i wsp. 2003; Li i wsp. 2005). Obserwowane stężenie IL-8 dla grupy komórek traktowanych ekstraktami tkanek po decelularyzacji metodą E2 w przeważającej większości nie odbiegały od wartości kontrolnych. Jedynie ekstrakt E2GA3 wywołał inhibicję wydzielania tej

cytokiny. W przypadku grupy ekstraktów uzyskanych z tkanek po decelularyzacji metodą D1 zanotowany był wyraźny spadek wydzielania tej cytokiny przez komórki, której stężenie utrzymywało się poniżej poziomu detekcji dla E1GA2 i E1GA3. Podobnie jak w przypadku IL-6 konsekwencją takiej sytuacji mogło być spowolnienie proliferacji, a także zmniejszająca się liczba komórek żywych w badanych próbach. Badania obu cytokin wskazują, iż ekstrakty tkankowe nie stymulowały komórek śródbłónka do spontanicznego wydzielania IL-6 oraz IL-8, których podwyższone stężenia wskazywałyby raczej na reakcję zapalną.

5.3 Podsumowanie

Znalezienie optymalnej metody otrzymywania biokompatybilnego rusztowania o odpowiednich właściwościach biomechanicznych wciąż stanowi wyzwanie w dziedzinie inżynierii tkankowej. Dostępne dotychczas dane w literaturze obrazują duże zróżnicowanie wśród faworyzowanych metod usuwania i sieciowania tkanek. Podyktowane to jest odmiennością warunków przeprowadzanego eksperymentu, rodzajem tkanki, a także celem w jakim to rusztowanie będzie użyte. Stosowane do usuwania komórek metody w prezentowanej pracy charakteryzowały się różną wydajnością oraz wpływem na elementy macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki. Przeprowadzone badania wykazały, iż właściwości biomechaniczne rusztowań po decelularyzacji odbiegały od właściwości naturalnej, niezmienionej tkanki. Użycie niskich stężeń aldehydu glutarowego (GA) przybliżyło wartości mierzonych parametrów do tkanki natywnej, jednak w większości przypadków stężenia te okazały się za niskie. Sieciowanie wybranymi stężeniami GA zabezpieczało rusztowania przed degradacją enzymatyczną, ale nie wyeliminowało problemu kalcyfikacji matrycy. Stwierdzono także iż, na proces wapnienia matrycy ma wpływ rodzaj tkanki, jej grubość i metoda usuwania komórek z tkanki. Próby zasiedlania modyfikowanych rusztowań również wykazały różnice pomiędzy stosowanymi metodami decelularyzacji oraz zastosowanymi stężeniami. Choć na każdej matrycy można było zaobserwować żywe komórki śródbłónka, analiza morfologii komórek, elementów cytoszkieletu i sekrecji cytokin wykazała, iż komórki te charakteryzują się dużą wrażliwością na kontakt z matrycami i ekstraktami tkankowymi. Wybrane stężenia GA okazały się mieć jednak znikomy efekt cytotoksyczny, który był bezpośrednio skorelowany z metodą otrzymywania rusztowania. Komercyjnie stosowane stężenia aldehydu glutarowego ze względu na wysoką cytotoksyczność, uniemożliwiają reendotelializację implantów w warunkach *in vitro* lub *in vivo*. Zastosowanie niskich stężeń aldehydu glutarowego pozwala jednak na zasiedlanie rusztowań komórkami śródbłónka, która może stanowić naturalny element zabezpieczający przed aktywacją układu płytkowego oraz przed kalcyfikacją.

6 WNIOSKI

1. Zastosowane metody otrzymywania decelularnego kolagenowego rusztowania – D1 (enzymatyczna) i D2 (detergentowa), różniły się efektywnością usuwania komórek z tkanki na korzyść metody D2.
 - a. Większą efektywność decelularyzacji przy jednocześnie lepszym zachowaniu struktur macierzy zewnątrzkomórkowej rusztowań, otrzymano przy zastosowaniu metody D2.
 - b. Niepełna decelularyzacja tkanki metodą D1 może prowadzić do wzmożonej reakcji immunologicznej organizmu potencjalnego biorcy, przyspieszoną degradację i kalcyfikację implantu, co może dyskwalifikować takie rusztowanie do zastosowania klinicznego.
2. Zarówno metoda D1 jak i D2 wpłynęły istotnie na obniżenie właściwości biomechanicznych tkanki, jednak decelularyzacja metodą D1 powodowała większą degradację i upośledzenie właściwości biomechanicznych w stosunku do tkanki natywnej.
3. Zastosowanie niskich stężeń aldehydu glutarowego (0,025% GA; 0,05% GA) jako czynnika sieciującego tkankę w celu poprawy jej właściwości biomechanicznych wykazało efektywność tylko w przypadku rusztowań otrzymanych metodą D2. Najniższe zastosowane stężenie GA (0,0125%) okazało się nieefektywne w stabilizacji struktury ECM rusztowań, a jedynie skrajne stężenia GA (0,025% i 0,05%) przybliżały profil biomechaniczny matrycy otrzymanych metodą D2 do tkanki natywnej.
4. Stopień kalcyfikacji rusztowań był różny dla badanych fragmentów zastawki płucnej – naczyń (n) i płatków (p) i był zależny od zastosowanego stężenia GA.
 - a. Rusztowania naczyń modyfikowanych GA cechował wyższy stopień zwapnienia dla stężeń GA 0,05% lub zbliżony dla stężeń 0,0125% i 0,025% GA, do zaobserwowanej kalcyfikacji tkanek natywnych traktowanych tymi samymi stężeniami GA.
 - b. Tylko rusztowania płatków otrzymanych metodą D2 nie wykazywały śladów zwapnienia, nawet po modyfikacji GA, co wyróżniało się na tle wyników dla matrycy otrzymanych metodą D1 i płatków natywnych. Świadczyć to może o korzystnym działaniu metody decelularyzacji D2 i dobrym wypłukaniu reszt GA z cienkich struktur jakimi są płatki zastawki

płucnej. Stanowi to dobrą bazę do opracowania metody modyfikacji tkanki ograniczającą do minimum proces kalcyfikacji.

5. Zastosowanie niskich stężeń aldehydu glutarowego umożliwiło zasiedlenie modyfikowanych rusztowań komórkami śródbłonka bez wywołania istotnego efektu cytotoksyczności we wszystkich badanych próbach.
 - a. Szczegółowa analiza żywotności komórek, ich morfologii i sekrecji badanych cytokin wykazała wzrost efektu cytotoksycznego wraz ze wzrostem użytego stężenia GA, w przypadku zastosowania metody decelularyzacji D1.
 - b. Powyższe wyniki są przesłanką by sądzić, że efekt cytotoksyczności GA był sprzężony ze sposobem decelularyzacji metodą D1, co może wpłynąć na kondycję matrycy i zaburzyć stymulowanie naturalnych procesów remodelowania tkanki po jej ewentualnym wszczepieniu.
 - c. Efektywne wtórne zasiedlanie rusztowań kolagenowych modyfikowanych niskimi stężeniami GA zwiększa możliwość utworzenia na powierzchni implantu funkcjonalnej warstwy komórek śródbłonka, która w warunkach *in vivo* zabezpieczałaby bioprotezę przed kalcyfikacją.
6. Zastosowanie aldehydu glutarowego w stężeniu 0,025 i 0,05% w połączeniu z metodą decelularyzacji D2 tkanki pozwala na optymalizację właściwości biomechanicznych przy jednoczesnym zmniejszeniu efektu cytotoksycznego.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Alaribe F. N., Manoto S. L., Motaung S. C. K. M. 2016 Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia (Poland)*, **71**(4), 353–366. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0056>
2. Weymann A., Schmack B., Okada T., Soós P., Istók R., Radovits T. 2013 Reendothelialization of Human Heart Valve Neoscaffolds Using Umbilical Cord-Derived Endothelial cells. *Circulation Journal*, **77**, 207–216.
3. Alsoufi B. 2014 Aortic valve replacement in children: Options and outcomes. *Journal of the Saudi Heart Association*, **26**(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jsha.2013.11.003>
4. Alsoufi B., Manlhiot C., McCrindle B. W., Canver C. C., Sallehuddin A., Al-Oufi S., Joufan M., Al-Halees Z. 2009 Aortic and mitral valve replacement in children: is there any role for biologic and bioprosthetic substitutes? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **36**(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.02.048>
5. Andersen H. R. 2009 History of percutaneous aortic valve prosthesis. *Herz*, **34**(5), 343–346. <https://doi.org/10.1007/s00059-009-3251-4>
6. Anssari-Benam A., Bader D. L., Screen H. R. C. 2011 A combined experimental and modelling approach to aortic valve viscoelasticity in tensile deformation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **22**(2), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4210-6>
7. Araki R., Uda M., Hoki Y., Sunayama M., Nakamura M., Ando S., Sugiura M. 2013 Differentiated cells derived from induced pluripotent. *Nature*, **494**(7435), 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature11807>
8. Asahara T., Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., Zee R. Van Der, Li T., Witzensbichler B., Schatteman G., Isner J. M. 2012 Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis., **275**, 964–967. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.964>
9. Ashour Z A., Shawky H.A., Hassan Hussein M. 2000 Outcome of pregnancy in women with mechanical valves. *Texas Heart Institute Journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital*, **27**(3), 240–245.
10. Balguid A., Rubbens M. P., Mol A., Bank R. A., Bogers A. J. J. C., van Kats J. P., de Mol B. A. J. M., Baaijens F. P. T., Bouten C. V. C. 2007 The Role of Collagen Cross-Links in Biomechanical Behavior of Human Aortic Heart Valve Leaflets—Relevance for Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, **13**(7), 1501–1511. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0279>
11. Basude S., Hein C., Curtis S. L., Clark A., Trinder J. 2012 Low-molecular-weight heparin or warfarin for anticoagulation in pregnant women with mechanical heart valves:

- What are the risks? A retrospective observational study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **119**(8), 1008–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2012.03359.x>
12. Bateman M. G., Quill J. L., Hill A. J., Iaizzo P. A. 2013 The Anatomy and Function of the Semilunar Valves. 27–43. Laizzo P. A., Bianco R. W., Hill A. J., St Louis J. D. (red.), *From Design to Clinical Implantation*, Springer Science & Business Media. ISBN: 978-1-4614-6143-2. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6144-9>
 13. Beauchamp R. O., St Clair M. B., Fennell T. R., Clarke D. O., Morgan K. T., Kari F. W. 1992 A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**, 143–174. <https://doi.org/10.1097/00001610-199308000-00018>
 14. Berthiaume F., Maguire T. J., Yarmush M. L. 2011 Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **2**(1), 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
 15. Besterman E. M. M. 2009 William Harvey and his discovery of the circulation of the blood. *West Indian Medical Journal*, **53**(6), 425–426. <https://doi.org/10.1097/00007611-199112000-00019>
 16. Brewer R. J., Mentzer R. M. J., Deck J. D., Ritter R. C., Trefil J. S., Nolan S. P. 1977 An in vivo study of the dimensional changes of the aortic valve leaflets during the cardiac cycle. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **74**(4), 645–650.
 17. Brown B. N., Freund J. M., Han L., Rubin J. P., Reing J. E., Jeffries E. M., Wolf M. T., Tottey S., Barnes C. A., Ratner B. D., Badylak S. F. 2011 Comparison of Three Methods for the Derivation of a Biologic Scaffold Composed of Adipose Tissue Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **17**(4), 411–421. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0342>
 18. Bruck S. D. 1981 Possible causes for the calcification of glutaraldehyde-treated tissue heart valves and blood contacting elastomers during prolonged use in medical devices: a physico-chemical view. *Biomaterials*, **2**(1), 14–18. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(81\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(81)90081-8)
 19. Bunnell B. A., Flaatt M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. 2008 Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods (San Diego, Calif.)*, **45**(2), 115–20. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.006>
 20. Butcher J. T., Mahler G. J., Hockaday L. A. 2011 Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **63**(4), 242–268. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.008>
 21. Butcher J. T., Penrod A. M., García A. J., Nerem R. M. 2004 Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow

- environments. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **24**(8), 1429–1434.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000130462.50769.5a>
22. Carew E. O., Patel J., Garg A., Houghtaling P., Blackstone E., Vesely I. 2003 Effect of specimen size and aspect ratio on the tensile properties of porcine aortic valve tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, **31**(5), 526–535.
<https://doi.org/10.1114/1.1568116>
 23. Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I., Hilfiker A., Mertsching H., Leyh R., Breymann T., Kallenbach K., Maniuc L., Batrinac A., Repin O., Maliga O., Ciubotaru A., Haverich A. 2006 Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*, **114**(1), 132–137.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001065>
 24. Cebotari S., Tudorache I., Jaekel T., Hilfiker A., Dorfman S., Ternes W., Haverich A., Lichtenberg A. 2010 Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artificial Organs*, **34**(3), 206–210. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00796.x>
 25. Chan W. S., Anand F. S., Ginsberg F. J. S. 2000 Anticoagulation of Pregnant Women With Mechanical Heart Valves. *Medicine*, **160**, 191–196.
 26. Charriere G., Bejot M., Schnitzler L., Ville G., Hartmann D. J. 1989 Reactions to a bovine collagen implant: Clinical and immunologic study in 705 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **21**(6), 1203–1208.
[https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70330-3](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70330-3)
 27. Charulatha V., Rajaram A. 2003 Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*, **24**(5), 759–767.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00412-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00412-X)
 28. Chester A. H., Taylor P. M. 2007 Molecular and functional characteristics of heart-valve interstitial cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **362**(1484), 1437–1443. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2126>
 29. Cheung D. T., Nimni M. E. 1985 Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connective Tissue Research*, **13**, 109–115. <https://doi.org/10.3109/03008208209034419>
 30. Christie G. W. 1992 Anatomy of aortic heart valve leaflets: the influence of glutaraldehyde fixation on function. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, **6** (1), 25–32.
 31. Tate C. C., Shear D. A., Tate M. C., Archer D. R., Stein D. G., LaPlaca M. C., 2009 Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **3**, 208–217.

<https://doi.org/10.1002/term>

32. Clark R. E. 1973 Stress-strain characteristics of fresh and frozen human aortic and mitral leaflets and chordae tendineae. Implications for clinical use. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **66**(2), 202–208.
33. Colazzo F., Chester A. H., Taylor P. M., Yacoub M. H. 2010 Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *The Journal of Heart Valve Disease*, **19**(6), 736–744.
34. Colazzo F., Sarathchandra P., Smolenski R. T., Chester A. H., Tseng Y., Czernuszka J. T., Yacoub M. H., Taylor P. M. 2011 Biomaterials Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells : Implications for heart valve tissue engineering. *Biomaterials*, **32**(1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.003>
35. Crapo P. M., Gilbert T. W., Badylak S. F. 2011 An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, **32**(12), 3233–3243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
36. Dal Pozzo A., Vanini L., Fagnoni M., Guerrini M., De Benedittis A., Muzzarelli R. A. A. 2000 Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-crosslinked reacylated chitosans. *Carbohydrate Polymers*, **42**(2), 201–206. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00134-4)
37. De la Puente P., Ludeña D. 2014 Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Experimental Cell Research*, **322**(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.017>
38. Deanfield J. E., Halcox J. P., Rabelink T. J. 2007 Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*, **115**(10), 1285–1295. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
39. Delmo Walter E. M., de By T. M. M. H., Meyer R., Hetzer R. 2012 The future of heart valve banking and of homografts: perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin. *HSR Proceedings in Intensive Care & Cardiovascular Anesthesia*, **4**(2), 97–108.
40. Desouza M., Gunning P. W., Stehn J. R. 2012 The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis., *BioArchitecture*, **2**(3)75–87.
41. Dijkman P. E., Driessen-Mol A., Frese L., Hoerstrup S. P., Baaijens F. P. T. 2012 Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials*, **33**(18), 4545–4554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.015>
42. Dong X., Wei X., Yi W., Gu C., Kang X., Liu Y., Li Q., Yi D. 2009 RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20**(11), 2327–2336.

- <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3791-4>
43. Drenthen W., Boersma E., Balci A., Moons P., Roos-Hesselink J. W., Mulder B. J. M., Vliegen H. W., Van Dijk A. P. J., Voors A. A., Yap S. C., Van Veldhuisen D. J., Pieper P. G. 2010 Predictors of pregnancy complications in women with congenital heart disease. *European Heart Journal*, **31**(17), 2124–2132.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq200>
 44. Du L., Wu X., Pang K., Yang Y. 2011 Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold., *British Journal of Ophthalmology*, **95**(3), 410–415. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.142539>
 45. Embryol R. J. M. 2018 Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering., *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, **59**(1), 71–76.
 46. Ethier, Ross and Simmons C. 2007 Arterial wall structure and elasticity, 183-186. *Introductory Biomechanics, From Cells to Organisms*. Cambridge University Press. ISBN: 978-0-521-84112-2
 47. Faulk D. M., Carruthers C. A., Warner H. J., Kramer C. R., Reing J. E., Zhang L., D'Amore A., Badylak S. F. 2014 The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomaterialia*, **10**(1), 183–193.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.006>
 48. Ferro M. D., Stolfo D., Paris V. De, Lesizza P., Korcova R., Collia D., Tonti G., Sinagra G., Pedrizzetti G. 2018 Cardiac fluid dynamics meets deformation imaging., 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12947-018-0122-2>
 49. Filová E., Straka F., Miřejovský T., Mašín J., Bačáková L. 2009 Tissue-engineered heart valves. *Physiological Research*, **58**(2), 141–150. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6144-9_11
 50. Flanagan T. C., Wilkins B., Black A., Jockenhoevel S., Smith T. J., Pandit A. S. 2006 A collagen-glycosaminoglycan co-culture model for heart valve tissue engineering applications. *Biomaterials*. **27**, 2233–2246.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.031>
 51. Flynn L. E. 2010 The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, **31**(17), 4715–4724.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.046>
 52. Gervaso F., Sannino A., Peretti G. M. 2013 The biomaterialist's task: Scaffold biomaterials and fabrication technologies. *Joints*, **1**(3), 130–137.
<https://doi.org/10.11138/jts/2013.1.3.130>
 53. Ghatak S., Maytin E. V., MacK J. A., Hascall V. C., Atanelishvili I., Moreno Rodriguez R.,

- Markwald R. R., Misra S. 2015 Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *International Journal of Cell Biology*, **2015**, 1-20. <https://doi.org/10.1155/2015/834893>
54. Gilbert T. W., Sellaro T. L., Badylak S. F. 2006 Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, **27**(19), 3675–3683. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
 55. Gillies A. R., Smith L. R., Lieber R. L., Varghese S. 2011 Method for Decellularizing Skeletal Muscle Without Detergents or Proteolytic Enzymes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **17**(4), 383–389. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0438>
 56. Głowińska-Olszewska, B., Luczyński, W., Bossowski A. 2011 Endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial function with respect to risk of cardiovascular disorders. *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **65**, 8–15.
 57. Goyal R., Vega M. E., Pastino A. K., Singh S., Guvendiren M., Kohn J., Murthy N. S., Schwarzbauer J. E. 2017 Development of hybrid scaffolds with natural extracellular matrix deposited within synthetic polymeric fibers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **105**(8), 2162–2170. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36078>
 58. Grabow N., Schmohl K., Khosravi A., Philipp M., Scharfschwerdt M., Graf B., Stamm C., Haubold A., Schmitz K.-P. P., Steinhoff G. 2004 Mechanical and Structural Properties of a Novel Hybrid Heart Valve Scaffold for Tissue Engineering. *Artificial Organs*, **28**(11), 971–979. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.00007.x>
 59. Gratzner P. F., Harrison R. D., Woods T. 2006 Matrix Alteration and Not Residual Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity Affects the Cellular Repopulation of a Decellularized Matrix. *Tissue Engineering*, **12**(10), 2975–2983. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2975>
 60. Grauss R. W., Hazekamp M. G., Oppenhuizen F., Van Munsteren C. J., Gittenberger-De Groot A. C., DeRuiter M. C. 2005 Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **27**(4), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2004.12.052>
 61. Hasan A., Ragaert K., Swieszkowski W., Selimović Š., Paul A., Camci-Unal G., Mofrad M. R. K., Khademhosseini A. 2014 Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *Journal of Biomechanics*, **47**(9), 1949–1963. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.09.023>
 62. He M., Callanan A. 2013 Comparison of Methods for Whole-Organ Decellularization in Tissue Engineering of Bioartificial Organs. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **19**(3), 194–208. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0340>
 63. Hinton R. B., Yutzey K. E. 2011 Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annual Review of Physiology*, **73**, 29–46. <https://doi.org/10.1146/annurev->

physiol-012110-142145

64. Hirschi K. K., Li S., Roy K. 2014 Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine., *Annual Review of Biomedical Engineering*, **16**, 277–294.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105108>
65. Hoerstrup S. P., Kadner A., Melnitchouk S., Trojan A., Eid K., Tracy J., Sodian R., Visjager J. F., Kolb S. A., Grunenfelder J., Zund G., Turina M. I. 2002 Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation*, **106**(1), 143–150. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000032872.55215.05>
66. Hoerstrup S. P., Sodian R., Daebritz S., Wang J., Bacha E. A., Martin D. P., Moran A. M., Guleserian K. J., Sperling J. S., Kaushal S., Vacanti J. P., Schoen F. J., Mayer J. E. 2000 Functional Living Trileaflet Heart Valves Grown In Vitro. *Circulation*, **102**(3), 44-49.
https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.suppl_3.III-44
67. Holzapfel G. A., Gasser T. C., Ogden R. W. 2000 A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models. *Journal of Elasticity*, **61**, 1–48. <https://doi.org/10.1023/A:1010835316564>
68. Huang L. L. H., Sung H. W., Tsai C. C., Huang D. M. 1998 Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *Journal of Biomedical Materials Research*, **42**(4), 568–576. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19981215\)42:4<568::AID-JBM13>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19981215)42:4<568::AID-JBM13>3.0.CO;2-7)
69. Ibrahim D. M., Kakaroungkas A., Allam N. K. 2017 Recent advances on electrospun scaffolds as matrices for tissue-engineered heart valves. *Materials Today Chemistry*, **5**(9), 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2017.05.001>
70. Iop L., Gerosa G. 2015 Guided Tissue Regeneration in Heart Valve Replacement: From Preclinical Research to First-in-Human Trials. *BioMed Research International*, **2015**, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/432901>
71. Jayakrishnan A., Jameela S. R. 1996 Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, **17**(5), 471–484. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)82721-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)82721-9)
72. Jeong S., Yoon E. J., Lim H. G., Sung S. C., Kim Y. J. 2013 The Effect of Space Fillers in the Cross-Linking Processes of Bioprosthesis. *BioResearch Open Access*, **2**(2), 98–106.
<https://doi.org/10.1089/biores.2012.0289>
73. Kaphingst K. A., Persky S., Lachance C. 2010 Straightening of curved pattern of collagen fibers under load controls aortic valve shape., *Journal of Biomechanics*, **14**(4), 384–399.
<https://doi.org/10.1080/10810730902873927>.Testing
74. Kasimir M.-T., Rieder E., Seebacher G., Nigisch A., Dekan B., Wolner E., Weigel G., Simon P. 2006 Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory

- stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease*, **15**(2), 278–86; discussion 286.
75. Kawecki M., Łabuś W., Klama-Baryla A., Kitala D., Kraut M., Glik J., Misiuga M., Nowak M., Bielecki T., Kasperczyk A. 2018 A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, **106**(2), 909–923. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33865>
 76. Keane T. J., Londono R., Carey R. M., Carruthers C. A., Reing J. E., Dearth C. L., D'Amore A., Medberry C. J., Badylak S. F. 2013 Preparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. *Biomaterials*, **34**(28), 6729–6737. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.052>
 77. Keane T. J., Swinehart I. T., Badylak S. F. 2015 Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*, **84**(3), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>
 78. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. 2006 Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, **24**(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
 79. Kheradvar A., Zareian R., Kawauchi S., Goodwin R. L., Rugonyi S. 2017 Animal models for heart valve research and development. *Drug Discovery Today: Disease Models*, **24**(20), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.04.001>
 80. Khor E. 1997 Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials*, **18**(2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00106-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00106-8)
 81. Kielty, C.M., Grant M. E. 2002 The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. *Wiley-Liss*, **2**(1)159 –221. <https://doi.org/10.1002/0471221929.ch2>
 82. Kim K. M. 2001 Cellular mechanism of calcification and its prevention in glutaraldehyde treated vascular tissue. *Zeitschrift Fur Kardiologie*, **90**(3), 99–105. <https://doi.org/10.1007/s003920170195>
 83. Korossis S. A., Booth C., Wilcox H. E., Watterson K. G., Kearney J. N., Fisher J., Ingham E. 2002 Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease*, **11**(4), 463–471.
 84. Langer R., Vacanti J. P. 1993 - ARTICLES Tissue Engineering. *Science*, **260**(5), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
 85. Latif N., Sarathchandra P., Taylor P. M., Antoniow J., Yacoub M. H. 2005 Localization and Pattern of Expression of Extracellular Matrix Components in Human Heart Valves. *The*

Journal of Heart Valve Disease, **14**(2), 218–227.

86. Lee C., Lim H. G., Lee C. H., Kim Y. J. 2017 Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: Implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, **24**(3), 402–406. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivw356>
87. Lee J. M., Courtman D. W., Boughner D. R. 1984 The glutaraldehyde-stabilized porcine aortic valve xenograft. I. Tensile viscoelastic properties of the fresh leaflet material. *Journal of Biomedical Materials Research*, **18**(1), 61–77. <https://doi.org/10.1002/jbm.820180108>
88. Leeson-Dietrich J., Boughner D., Vesely I. 1995 Porcine pulmonary and aortic valves: a comparison of their tensile viscoelastic properties at physiological strain rates. *The Journal of Heart Valve Disease*, **4**(1), 88–94.
89. Lennon F. E., Singleton P. A. 2011 Hyaluronan regulation of vascular integrity. *American Journal of Cardiovascular Disease*, **1**(3), 200–213.
90. Leopold J. A., Bloomfield P., Schmidt D., Hoerstrup S. P. 2002 Valve disease Choice of heart valve prosthesis. *Heart (British Cardiac Society)*, **87**, 583–589. <https://doi.org/10.1136/heart.87.6.583>
91. Li A., Dubey S., Varney M. L., Dave B. J., Singh R. K. 2003 IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *The Journal of Immunology*, **170**(6), 3369–3376. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
92. Li A., Varney M. L., Valasek J., Godfrey M., Dave B. J., Singh R. K. 2005 Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis*, **8**(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-5208-4>
93. Lim H. G., Kim G. B., Jeong S., Kim Y. J. 2015 Development of a next-generation tissue valve using a glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve treated with decellularization, α -galactosidase, space filler, organic solvent and detoxification. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **48**(1), 104–113. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu385>
94. Lim H. G., Kim S. H., Choi S. Y., Kim Y. J. 2012 Anticalcification effects of decellularization, solvent, and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **41**(2), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2011.05.016>
95. Liu T., Guevara O. E., Warburton R. R., Hill N. S., Gaestel M., Kayyali U. S. 2010 Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J*

- Physiol Cell Physiol*, **299**, 363–373. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00057.2010>
96. Loganadane L. D., Berge N., Legrand C., Fauvel-Lafeve F. 1997 Endothelial cell proliferation regulated by cytokines modulates trombospondin-1 secretion into the subendothelium. *Cytokine*, **9**(10), 740–746. <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0229>
 97. Lumpkins S. B., Pierre N., McFetridge P. S. 2008 A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomaterialia*, **4**(4), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.01.016>
 98. Maganti K., Rigolin V. H., Sarano M. E., Bonow R. O. 2010 Valvular heart disease: Diagnosis and management. *Mayo Clinic Proceedings*, **85**(5), 483–500. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0706>
 99. Mahler G. J., Frendl C. M., Cao Q., Butcher J. T. 2014 Effects of shear stress pattern and magnitude on mesenchymal transformation and invasion of aortic valve endothelial cells. *Biotechnology and Bioengineering*. **111**(11): 2326–2337. <https://doi.org/10.1002/bit.25291>
 100. Manji R. A., Lee W., Cooper D. K. C. 2015a Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future. *International Journal of Surgery*, **23**, 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.07.009>
 101. Marinucci L., Lilli C., Guerra M., Belcastro S., Becchetti E., Stabellini G., Calvi E. M., Locci P. 2003 Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: An in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **67**(2), 504–509. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10082>
 102. Marinval N., Morenc M., Labour M. N., Samotus A., Mzyk A., Ollivier V., Maire M., Jesse K., Bassand K., Niemiec-Cyganek A., Haddad O., Jacob M. P., Chaubet F., Charnaux N., Wilczek P., Hlawaty H. 2018 Fucoidan/VEGF-based surface modification of decellularized pulmonary heart valve improves the antithrombotic and Re-endothelialization potential of bioprostheses. *Biomaterials*, **172**, 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.054>
 103. Maxfield M. W., Cleary M. A., Breuer C. K. 2013 Tissue-Engineering Heart Valves , 813-833. *Principles of Tissue Engineering*. Lanza R., Langer R., Vacanti J. (red.) Elsevier. ISBN: 978-0-12-398358-9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00040-9>
 104. Mazibuko B., Ramnarain H., Moodley J. 2012 An audit of pregnant women with prosthetic heart valves at a tertiary hospital in South Africa. *Cardiovascular Journal of Africa*, **23**(4), 216–221. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2012-022>
 105. Mendelson K., Schoen F. J. 2006 Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges. *Annals of Biomedical Engineering*, **34**(12), 1799–1819.

- <https://doi.org/10.1007/s10439-006-9163-z>
106. Mendoza-Novelo B., Cauich-Rodríguez J. V.. 2011a. Decellularization, Stabilization and Functionalization of Collagenous Tissues Used as Cardiovascular Biomaterials, 159-182, Pignatello R. (red.), *Biomaterials – Physics and Chemistry*. INTECH. ISBN 978-953-307-418-4
 107. Mendoza-Novelo B., Avila E. E., Cauich-Rodríguez J. V., Jorge-Herrero E., Rojo F. J., Guinea G. V., Mata-Mata J. L. 2011b Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomaterialia*, **7**(3), 1241–1248. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.017>
 108. Mercuri J. J., Lovekamp J. J., Simionescu D. T., Vyavahare N. R. 2007 Glycosaminoglycan-targeted fixation for improved bioprosthetic heart valve stabilization. *Biomaterials*, **28**(3), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.005>
 109. Meuris B., Phillips R., Moore M. A., Flameng W. 2003 Porcine stentless bioprostheses: Prevention of aortic wall calcification by dye-mediated photo-oxidation. *Artificial Organs*, **27**(6), 537–543. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2003.07108.x>
 110. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M. J., Waldron K. C. 2004 Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, **37**(5), 790–802. <https://doi.org/10.2144/3705A0790>
 111. Millán J., Cain R. J., Reglero-Real N., Bigarella C., Marcos-Ramiro B., Fernández-Martín L., Correas I., Ridley A. J. 2010 Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biology*, **8**(11), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-11>
 112. Misfeld M., Sievers H. 2007 Heart valve macro- and microstructure., *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, **362**, 1421–1436. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2125>
 113. Montoya C. V., McFetridge P. S. 2009 Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, **15**(2), 191–200. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0372>
 114. Moore M. A., Samsell B., Wallis G., Triplett S., Chen S., Jones A. L., Qin X. 2015 Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review. *Cell and Tissue Banking*, **16**(2), 249–259. <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9467-4>
 115. Nair K., Muraleedharan C., Bhuvaneshwar G. 2003 Developments in mechanical heart valve prosthesis. *Sadhana*, **28**, 575–587. <https://doi.org/10.1007/BF02706448>
 116. Naso F., Gandaglia A., Bottio T., Tarzia V., Nottle M. B., D'Apice A. J. F., Cowan P. J., Cozzi E., Galli C., Lagutina I., Lazzari G., Iop L., Spina M., Gerosa G. 2013 First quantification of

- alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. *Xenotransplantation*, **20**(4), 252–261. <https://doi.org/10.1111/xen.12044>
117. Nazareth E. J. P., Ostblom J. E. E., Lückner P. B., Shukla S., Alvarez M. M., Oh S. K. W., Yin T., Zandstra P. W. 2013 High-throughput fingerprinting of human pluripotent stem cell fate responses and lineage bias., *Nature Methods*, **10**(12), 1225 - 1233. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2684>
 118. Neethling W., Brizard C., Firth L., Glancy R. 2014 Biostability, durability and calcification of cryopreserved human pericardium after rapid glutaraldehyde-stabilization versus multistep adapt®treatment in a subcutaneous rat model. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **45**(4), 110–117. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt623>
 119. Nonaka P. N., Campillo N., Uriarte J. J., Garreta E., Melo E., De Oliveira L. V. F., Navajas D., Farré R. 2014 Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **102**(2), 413–419. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34708>
 120. O'Neill J. D., Anfang R., Anandappa A., Costa J., Javidfar J., Wobma H. M., Singh G., Freytes D. O., Bacchetta M. D., Sonett J. R., Vunjak-Novakovic G. 2013 Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Annals of Thoracic Surgery*, **96**(3), 1046–1055. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.04.022>
 121. Olde Damink L. H. H., Dijkstra P. J., Van Luyn M. J. A., Van Wachem P. B., Nieuwenhuis P., Feijen J. 1995 Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **6**(8), 460–472. <https://doi.org/10.1007/BF00123371>
 122. Parasuraman S., Walker S., Loudon B. L., Gollop N. D., Wilson A. M., Lowery C., Frenneaux M. P. 2016 Assessment of pulmonary artery pressure by echocardiography- A comprehensive review. *IJC Heart and Vasculature*, **12**, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2016.05.011>
 123. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. 2010 Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, **3**(3), 1863–1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
 124. Park S., Kim S. H., Lim H. G., Lim C., Kim Y. J. 2013 The anti-calcification effect of dithiobispropionimide, carbodiimide and ultraviolet irradiation cross-linking compared to glutaraldehyde in rabbit implantation models. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **46**(1), 1–13. <https://doi.org/10.5090/kjtcs.2013.46.1.1>
 125. Parvin Nejad S., Blaser M. C., Santerre J. P., Caldarone C. A., Simmons C. A. 2016 Biomechanical conditioning of tissue engineered heart valves: Too much of a good

- thing? *Advanced Drug Delivery Reviews*, **96**, 161–175.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.003>
126. Petersen T. H., Calle E. A., Colehour M. B., Niklason L. E. 2012 Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs*, **195**(3), 222–231.
<https://doi.org/10.1159/000324896>
 127. Petukhov D. S., Selishchev S. V., Telyshev D. V. 2015 Total Artificial Heart: State-of-the-art. *Biomedical Engineering*, **49**(4), 193–196. <https://doi.org/10.1007/s10527-015-9528-4>
 128. Pibarot P., Dumesnil J. G. 2009 Prosthetic heart valves: Selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*, **119**(7), 1034–1048.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886>
 129. Pober J. S., Sessa W. C. 2007 Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, **7**(10), 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
 130. Poornejad N., Schaumann L. B., Buckmiller E. M., Momtahan N., Gassman J. R., Ma H. H., Roeder B. L., Reynolds P. R., Cook A. D. 2016 The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix. *Journal of Biomaterials Applications*, **31**(4), 521–533.
<https://doi.org/10.1177/0885328216656099>
 131. Prasain N., Stevens T. 2009 The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular Research*, **77**(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.09.012>
 132. Prasertsung I., Kanokpanont S., Bunaprasert T., Thanakit V., Damrongsakkul S. 2008 Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, **85**(1), 210–219. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30938>
 133. Quinn J., Von Klemperer K., Brooks R., Peebles D., Walker F., Cohen H. 2009 Use of high intensity adjusted dose low molecular weight heparin in women with mechanical heart valves during pregnancy: A single-center experience. *Haematologica*, **94**(11), 1608–1612. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.002840>
 134. Quint C., Kondo Y., Manson R. J., Lawson J. H., Dardik A., Niklason L. E. 2011 Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(22), 9214–9219.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019506108>
 135. Rabkin-Aikawa E., Mayer J. E., Schoen F. J. 2005 Heart Valve Regeneration. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, **94**, 141–179. <https://doi.org/10.1007/b100003>
 136. Revenu C., Athman R., Robine S., Louvard D. 2004 The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**(8), 635–646.
<https://doi.org/10.1038/nrm1437>

137. Rieder E., Seebacher G., Kasimir M. T., Eichmair E., Winter B., Dekan B., Wolner E., Simon P., Weigel G. 2005 Tissue engineering of heart valves: Decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation*, **111**(21), 2792–2797.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.473629>
138. Roe S. C., Milthorpe B. K., Schindhelm K. 1990 Collagen Cross-Linking and Resorption: Effect of Glutaraldehyde Concentration. *Artificial Organs*, **14**(6), 443–448.
<https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.1990.tb03001.x>
139. Roosens A., Somers P., De Somer F., Carriel V., Van Nooten G., Cornelissen R. 2016 Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, **44**(9), 2827–2839.
<https://doi.org/10.1007/s10439-016-1555-0>
140. Russell A. D., Hopwood D. 1976 4 The Biological Uses and Importance of Glutaraldehyde. *Progress in Medicinal Chemistry*, **13**(C), 271–301.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70140-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70140-1)
141. Sacks M. S., David Merryman W., Schmidt D. E. 2009 On the biomechanics of heart valve function. *Journal of Biomechanics*, **42**(12), 1804–1824.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.05.015>
142. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. 2011 The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1813**(5), 878–888.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
143. Schenke-Layland K., Vasilevski O., Opitz F., König K., Riemann I., Halbhuber K. J., Wahlers T., Stock U. A. 2003 Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *Journal of Structural Biology*, **143**(3), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.08.002>
144. Schmidt, D; Hoerstrup S. P. 2005 Tissue engineered heart valves based on human cells. *Journal of Clinical Epidemiology*, **58**(5), I. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(05\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(05)00103-4)
145. Schmidt D., Achermann J., Odermatt B., Genoni M., Zund G., Hoerstrup S. P. 2008 Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering. *The Journal of Heart Valve Disease*, **17**(4), 446–55; discussion 455.
146. Schmidt D. R., Mol A., Breymann C., Achermann J., Odermatt B., Gössi M., Neuenschwander S., Prêtre R., Genoni M., Zund G., Hoerstrup S. P. 2006a Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors.

- Circulation*, **114**(1), 125–132.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001040>
147. Schmidt D. R., Mol A., Odermatt B., Neuenschwander S., Breymann C., Ssi M. G., Genoni M., Zund G., Hoerstrup S. P. 2006b Engineering of Biologically Active Living Heart Valve Leaflets Using Human Umbilical Cord-Derived Progenitor Cells. *Tissue Engineering*, **12**(11), 3223–3232.
 148. Schoen F. J. 2012 Mechanisms of Function and Disease of Natural and Replacement Heart Valves. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **7**(1), 161–183.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130257>
 149. Schoen F. J. 2016 Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease. *Cardiovascular Engineering and Technology*, **9**, 126–140. <https://doi.org/10.1007/s13239-016-0277-7>
 150. Schoen F. J., Hoerstrup S. P. 2013 Heart Valve Tissue Engineering. *Biomaterials Science*, **2004**, 1246–1261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00116-9>
 151. Schoen F. J., Levy R. J. 1999 Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research*, **47**(4), 439–65.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19991215\)47:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19991215)47:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-O)
 152. Schoen F. J., Levy R. J. 2005 Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention. *Annals of Thoracic Surgery*, **79**(3), 1072–1080.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.06.033>
 153. Scott Rapoport H., Connolly J. M., Fulmer J., Dai N., Murti B. H., Gorman R. C., Gorman J. H., Alferiev I., Levy R. J. 2007 Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate. *Biomaterials*, **28**(4), 690–699.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.029>
 154. Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. 2004 Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1666**, 105–117.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011>
 155. Shah S. R., Vyavahare N. R. 2008 The effect of glycosaminoglycan stabilization on tissue buckling in bioprosthetic heart valves. *Biomaterials*, **29**(11), 1645–1653.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.009>
 156. Sheridan W. S., Duffy G. P., Murphy B. P. 2012 Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **8**, 58–70.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.12.003>

157. Simionescu D. T. 2004 Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves : challenges and perspectives. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **4**(12), 1971–1985.
158. Simionescu D. T., Lu Q., Song Y., Jeoung S. L., Rosenbalm T. N., Kelley C., Vyavahare N. R. 2006 Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds. *Biomaterials*, **27**(5), 702–713.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.013>
159. Singer D. E., Chang Y., Fang M. C., Borowsky L. H., Pomernacki N. K. 2009 The Net Clinical Benefit of Warfarin Anticoagulation in Atrial. *Annals of Internal Medicine*, **151**, 297–306.
160. Sinha P., Zurakowski D., Susheel Kumar T. K., He D., Rossi C., Jonas R. A. 2012 Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **143**(1), 224–227. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.09.043>
161. Sodian R., Hoerstrup S. P., Sperling J. S., Martin D. P., Daebritz S., Mayer J. E. J., Vacanti J. P. 2000 Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. *American Society for Artificial Internal Organs*, **46**(1), 107–110.
162. Sodian R., Lueders C., Kraemer L., Kuebler W., Shakibaei M., Reichart B., Daebritz S., Hetzer R., Cells C. 2006 Tissue Engineering of Autologous Human Heart Valves Using Cryopreserved Vascular Umbilical. *The Annals of Thoracic Surgery*, **81**, 2207–2216.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2005.12.073>
163. Stradins P., Lacis R., Ozolanta I., Purina B., Ose V., Feldmane L., Kasyanov V. 2004 Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, **26**(3), 634–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2004.05.043>
164. Sun J. C., Davidson M. J., Lamy A., Eikelboom J. W. 2009 Antithrombotic management of patients with prosthetic heart valves: current evidence and future trends. *The Lancet*, **374**(9689), 565–576. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60780-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60780-7)
165. Sung H. W., Chen C. N., Chang Y., Liang H. F. 2002 Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*. *Biomaterials*, **23**(15), 3203–3214. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00072-8)
166. Sutherland F. W. H., Perry T. E., Yu Y., Sherwood M. C., Rabkin E., Masuda Y., Garcia G. A., McLellan D. L., Engelmayer G. C., Sacks M. S., Schoen F. J., Mayer J. E. 2005 From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation*, **111**, 2783–2791.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.498378>

167. Takahashi K, Yamanaka S. 2006 Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126**, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
168. Tedder M. E., Liao J., Weed B., Stabler C., Zhang H., Simionescu A., Simionescu D. T. 2009 Stabilized Collagen Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*, **15**(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0263>
169. Thubrikar M., Piepgrass W. C., Deck J. D., Nolan S. P. 1980 Stresses of Natural versus Prosthetic Aortic Valve Leaflets in vivo. *Annals of Thoracic Surgery*, **30**(3), 230–239. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(10\)61250-7](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(10)61250-7)
170. Tojkander S., Gateva G., Schevzov G., Hotulainen P., Naumanen P., Martin C., Gunning P. W., Lappalainen P. 2011 A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers. *Current Biology*, **21**(7), 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.007>
171. Tudorache I., Cebotari S., Sturz G., Kirsch L., Hurschler C., Hilfiker A., Haverich A., Lichtenberg A. 2007 Tissue Engineering of Heart Valves: Biomechanical and Morphological Properties of Decellularised Heart Valves. *Journal of Heart Valve Disease*, **16**(5), 567–573.
172. Turek A., Cwalina B., 2010 Some Irradiation-Influenced Features of Pericardial Tissues Engineered for Biomaterials, 543–568. Campolo D. (red.) *New Developments in Biomedical Engineering*. INTECH. ISBN: 978-953-7619-57-2
173. Usprech J., Chen W. L. K., Simmons C. A. 2016 Heart valve regeneration: The need for systems approaches. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **8**(2), 169–182. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1329>
174. Van Hagen I. M., Roos-Hesselink J. W., Ruys T. P. E., Merz W. M., Golland S., Gabriel H., Lelonek M., Trojnarowska O., Al Mahmeed W. A., Balint H. O., Ashour Z., Baumgartner H., Boersma E., Johnson M. R., Hall R. 2015 Pregnancy in Women with a Mechanical Heart Valve. *Circulation*, **132**(2), 132–142. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015242>
175. Van Wachem P. B., Brouwer L. A., Zeeman R., Dijkstra P. J., Feijen J., Hendriks M., Cahalan P. T., Van Luyn M. J. A. 2000 In vivo behavior of epoxy-crosslinked porcine heart valve cusps and walls. *Journal of Biomedical Materials Research*, **53**(1), 18–27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(2000\)53:1<18::AID-JBM3>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53:1<18::AID-JBM3>3.0.CO;2-J)
176. Vesely I. 2005 Heart Valve Tissue Engineering. *Circulation Research*, **97**(8), 743–755. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000185326.04010.9f>
177. Vorotnikova E., McIntosh D., Dewilde A., Zhang J., Reing J. E., Zhang L., Cordero K., Bedelbaeva K., Gourevitch D., Heber-Katz E., Badylak S. F., Braunhut S. J. 2010 Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell

- migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biology*, **29**(8), 690–700. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.08.007>
178. Vyavahare N. R., Hirsch D., Lerner E., Baskin J. Z., Zand R., Schoen F. J., Levy R. J. 1998 Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: Mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships. *Journal of Biomedical Materials Research*, **40**(4), 577–585. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980615\)40:4<577::AID-JBM9>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980615)40:4<577::AID-JBM9>3.0.CO;2-C)
 179. Walles T., Herden T., Haverich A., Mertsching H. 2003 Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials*, **24**(7), 1233–1239. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00490-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00490-8)
 180. Walter R. ., Matsuda T., Reyes H. ., Walter J., Hanumadass M. 1998 Characterisation of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. *Burns*, **24**, 104–113.
 181. Wang Q., Zhang C., Zhang L., Guo W., Feng G., Zhou S., Zhang Y., Tian T., Li Z., Huang F. 2014 The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **102**(12), 4301–4306. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35103>
 182. Weber B., Emmert M. Y., Hoerstrup S. P. 2012 Stem cells for heart valve regeneration. *Swiss Medical Weekly*, **142**(13622), 1-12. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13622>
 183. Weber E., Rossi A., Solito R., Sacchi G., Agliano' M., Gerli R. 2002 Focal adhesion molecules expression and fibrillin deposition by lymphatic and blood vessel endothelial cells in culture. *Microvascular Research*, **64**(1), 47–55. <https://doi.org/10.1006/mvre.2002.2397>
 184. White L. J., Taylor A. J., Faulk D. M., Keane T. J., Saldin L. T., Reing J. E., Swinehart I. T., Turner N. J., Ratner B. D., Badylak S. F. 2017 The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*, **50**, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>
 185. Xu C. C., Chan R. W., Tirunagari N. 2007 A Biodegradable, Acellular Xenogeneic Scaffold for Regeneration of the Vocal Fold Lamina Propria. *Tissue Engineering*, **13**(3), 551–566. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0169>
 186. Xu K., Kuntz L. A., Foehr P., Kuempel K., Wagner A., Tuebel J., Deimling C. V., Burgkart R. H. 2017 Efficient decellularization for tissue engineering of the tendon-bone interface with preservation of biomechanics. *PLoS ONE*, **12**(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171577>
 187. Xue Y., Sant V., Phillippi J., Sant S. 2017 Biodegradable and biomimetic elastomeric

- scaffolds for tissue-engineered heart valves. *Acta Biomaterialia*, **48**, 2–19.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.032>
188. Yang B., Zhang Y., Zhou L., Sun Z., Zheng J., Chen Y., Dai Y. 2010 Development of a Porcine Bladder Acellular Matrix with Well-Preserved Extracellular Bioactive Factors for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **16**(5), 1201–1211.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0311>
 189. Yang M., Chen C. Z., Wang X. N., Zhu Y. Bin, Gu Y. J. 2009 Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, **91**(1), 354–361.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31409>
 190. Yoo J. S., Kim Y. J., Kim S. H., Choi S. H. 2011 Study on genipin: A new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **44**(3), 197–207. <https://doi.org/10.5090/kjtcs.2011.44.3.197>
 191. Zang M., Zhang Q., Chang E. I., Mathur A. B., Yu P. 2012 Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **130**(3), 532–540.
<https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31825dc084>
 192. Zhai W., Chang J., Lin K., Wang J., Zhao Q., Sun X. 2006 Crosslinking of decellularized porcine heart valve matrix by procyanidins. *Biomaterials*, **27**(19), 3684–3690.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.008>
 193. Zhou J., Fritze O., Schleicher M., Wendel H. P., Schenke-Layland K., Harasztosi C., Hu S., Stock U. A. 2010 Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*, **31**(9), 2549–2554.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.088>
 194. Zhu J., Lu Y., Yu F., Zhou L., Shi J., Chen Q., Ding W., Wen X., Ding Y. Q., Mei J., Wang J. 2018 Effect of decellularized spinal scaffolds on spinal axon regeneration in rats. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **106**(3), 698–705.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36266>
 195. Zilla P., Bezuidenhout D., Human P. 2005 Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anticalcific effect of alpha-amino oleic acid on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. *Annals of Thoracic Surgery*, **79**(3), 905–910.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2003.12.026>
 196. Zilla P., Weissenstein C., Bracher M., Zhang Y., Koen W., Human P., von Oppell U. 1997 High glutaraldehyde concentrations reduce rather than increase the calcification of aortic wall tissue. *The Journal of Heart Valve Disease*, **6**(5), 502—509.
 197. Zvarova B., Uhl F. E., Uriarte J. J., Borg Z. D., Coffey A. L., Bonenfant N. R., Weiss D. J.,

Wagner D. E. 2016 Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **22**(5), 418–428.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0439>

8 STRESZCZENIE

Komercyjnie dostępne protezy zastawek serca (biologiczne oraz mechaniczne) stosowane do operacyjnego leczenia wad zastawek serca, przy ich licznych zaletach, posiadają w dalszym ciągu pewne ograniczenia. Trwa więc poszukiwanie protez o satysfakcjonujących właściwościach hemodynamicznych i biomechanicznych możliwych do zastosowań kardiochirurgicznych. Inżynieria tkankowa oferuje obiecujące alternatywy dla istniejących na rynku rozwiązań. Jedną ze strategii jest modyfikacja tkanek odzwierzęcych, która ograniczałaby immunogenność implantu, a jednocześnie umożliwiałaby naturalne procesy przebudowy bioprotezy w organizmie pacjenta. Koncepcja ta została wykorzystana w niniejszej pracy. Do badań wykorzystano rusztowania biologiczne otrzymywane na drodze decelularyzacji świńskiej zastawki płucnej serca. Do usunięcia komórek wykorzystano dwie metody – enzymatyczną (D1) oraz detergentową (D2). Dodatkowo w celu sieciowania i stabilizacji struktur macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) rusztowań, testowano niskie stężenia aldehydu glutarowego (GA – 0,0125%; 0,025%; 0,05%). Celem pracy było porównanie obu metod D1 i D2 oraz zbadanie wpływu stosowanych stężeń GA na właściwości biomechaniczne i biologiczne otrzymanych matryc, które porównywano do tkanki natywnej (N). Rusztowania badano pod kątem stopnia usunięcia komórek z tkanki, wpływu procesu decelularyzacji na struktury ECM, podatności rusztowań na degradację enzymatyczną i kalcyfikację oraz właściwości biomechanicznych. Sprawdzano także cytotoksyczność otrzymanych matryc, możliwość zasiedlenia ich komórkami śródbłonna oraz odpowiedź tych komórek na kontakt z modyfikowaną ECM. Badania wykazały, iż zastosowane metody decelularyzacji – D1 i D2 różniły się efektywnością usuwania komórek z tkanki na korzyść metody D2, która wykazywała dodatkowo widoczną przewagę w zachowaniu struktur ECM. Obie metody wpłynęły istotnie na obniżenie właściwości biomechanicznych tkanki, a zastosowanie niskich stężeń aldehydu glutarowego dało zadowalające efekty tylko w przypadku rusztowań otrzymanych metodą D2 traktowanych skrajnymi stężeniami GA (0,025% i 0,05%). Stopień kalcyfikacji rusztowań był różny dla badanych fragmentów zastawki płucnej – naczyń (n) i płatków (p) i zależny od zastosowanego stężenia GA. Tylko rusztowania płatków otrzymanych metodą D2 nie wykazywały śladów zwapnienia. Zastosowanie wybranych stężeń aldehydu glutarowego umożliwiło zasiedlenie modyfikowanych rusztowań komórkami śródbłonna, zauważono jednak, że wzrost efektu cytotoksyczności, był skorelowany z metodą otrzymywania rusztowań - D1. Powyższe obserwacje upoważniły do wyciągnięcia wniosku, iż zastosowanie aldehydu glutarowego w stężeniu 0,025% i 0,05% w połączeniu z metodą decelularyzacji tkanki – D2, pozwala na optymalizację właściwości biomechanicznych kolagenowych rusztowań przy jednoczesnym zmniejszeniu efektu cytotoksycznego.

Commercially available prosthetic heart valves (biological and mechanical) are used for the surgical treatment of heart valve defects, however they still have some limitations. Therefore, the search for prostheses with improved hemodynamics and biomechanical properties possible for cardiac surgery is ongoing. Tissue engineering offers promising alternatives to the existing solutions on the market. One strategy is the modification of xenogeneic tissues, this would limit the immunogenicity of the implant, and at the same time would enable the natural processes of bioprosthesis remodeling. This concept was explored in this this work. Biological scaffolds obtained by decellularization of the porcine pulmonary heart valve were used for the study. Two methods were used to remove the cells - enzymatic (D1) and detergent (D2). Additionally, in order to cross-link and stabilize the structures of extracellular matrix (ECM) of scaffolds, low concentrations of glutaraldehyde (GA - 0.0125%, 0.025%, 0.05%) were tested. The aim of the study was to compare both methods D1 and D2 and to examine the effect of applied GA concentrations on the biomechanical and biological properties of the obtained matrices, which were compared to the native tissue (N). Scaffolds were examined for the degree of cell removal from tissue, the effect of decellularization on ECM structures, scaffold susceptibility to enzymatic degradation and calcification, as well as biomechanical properties. The cytotoxicity of the obtained matrices was also checked, as well as the possibility of colonization by endothelial cells and the response of these cells to the contact with the modified ECM. The studies presented that the applied decellularization methods - D1 and D2 differed in the efficiency of removing cells from the tissue in favor of the D2 method, which showed an additional visible advantage in the preservation of ECM structures. Both methods significantly influenced the biomechanical properties of the tissue and the use of low concentrations of glutaraldehyde gave satisfactory results only in the case of scaffolds obtained by the D2 method when treated with extreme concentrations of GA (0.025% and 0.05%). The degree of the calcification of scaffolds was different for the examined fragments of the pulmonary valve - vessels (n) and leaflets (p) and depending on the used GA concentration. Only the scaffolding of the leaflets obtained by the D2 method showed no signs of calcification. The use of selected concentrations of glutaraldehyde enabled the colonization of modified scaffolds with endothelial cells, however, it was noted that the increase in the cytotoxicity effect was correlated with the method of obtaining scaffolds - D1. The above observations allow the conclusion that the use of glutaraldehyde in concentrations of 0.025% and 0.05% in combination with the tissue decellularization method - D2, allows optimization of biomechanical properties of collagen scaffolds while reducing the cytotoxic effect.

9 SPIS RYCIN

Ryc. 1-1 Reprezentatywne zdjęcie przekroju poprzecznego płatką zastawki aortalnej, po wybarwieniu pentachromem Movat'a, kolagen – kolor żółty, elastyna i jądra komórkowe – kolor purpurowy, glikozaminoglikany – kolor niebieski (zdjęcie zaczerpnięte z. Usprech i wsp. 2016) B. Schemat przekroju poprzecznego płatką zastawek płucnej i aortalnej (wg Schoen 2012).....	10
Ryc. 1-2 Schemat obrazujący ułożenie włókien kolagenowych i elastynowych w fазie skurczu i rozkurczu serca (wg Schoen 2012).....	11
Ryc. 1-3 Schemat przedstawiający budowę naczynia tętnicy płucnej (na podstawie Holzapfel i wsp. 2000; https://smart.servier.com).....	12
Ryc. 1-4 Schemat obrazujący mechanizmy warunkujące defekty zastawek oraz ich adaptację do warunków środowiska (wg Schoen 2016, zmodyfikowany)	14
Ryc. 1-5 Typowa jednoosiowa krzywa naprężenia od odkształcenia dla tkanek miękkich, takich jak płatką zastawki aortalnej i płucnej serca (wg Hasan i wsp.2014; zmodyfikowany).	15
Ryc. 1-6 Schemat możliwych reakcji aldehydu glutarowego (2.) z wolnymi grupami aminowymi białek (1.) (wg Olde Damink i wsp. 1995; - zmodyfikowany).....	22
Ryc. 1-7 Schematyczne przedstawienie trzech strategii inżynierii tkankowej (schemat własny na podstawie Ibrahim i wsp. 2017; https://smart.servier.com)	31
Ryc. 1-8 Dostępne źródła komórek macierzystych wykorzystywanych w inżynierii tkankowej, Na schemacie przedstawiono potencjalne tkanki dawców oraz typy pozyskiwanych z nich komórek (schemat własny na podstawie Weber i wsp. 2012b); https://smart.servier.com	32
Ryc. 3-1 Zdjęcia przedstawiają kolejno: a) wypreparowaną zastawkę pnia płucnego, b) rozciętą zastawkę pnia płucnego z zaznaczonymi płatkami oraz naczyniem, c) wypreparowane płatki oraz fragment naczynia pnia płucnego	38
Ryc. 3-2 Przykładowe obrazy histologiczne naczyń zastawki pnia płucnego wybarwione techniką wg Massona. Zielony kolor i jego intensywność wskazuje na obecność włókien kolagenowych w tkance.....	43
Ryc. 3-3 Przykładowe obrazy histologiczne naczyń zastawki pnia płucnego wybarwione techniką wg Verhoeff-van Giesona. (VEG) Ciemno granatowy lub czarny kolor i jego intensywność wskazują na obecność włókien elastynowych w tkance	44
Ryc. 3-4 Przykładowe obrazy histologiczne naczyń zastawki pnia płucnego wybarwione błękitem alcjanowym (ALB). Niebieski kolor i jego intensywność wskazują na obecność i ilość glikozaminoglikanów (GAG) w tkance	49

Ryc. 3-5 Zdjęcia przedstawiają preparaty histologiczne wybarwione czerwienią alizarynową S. Czerwony kolor i jego intensywność wskazuje na obecność i ilość złogów wapnia w tkance.....	47
Ryc. 3-6 Schemat przedstawiający rozmieszczenie próbek modyfikowanych matryc w naczyniach 24 dołkowych. https://smart.servier.com	53
Ryc. 3-7 Zdjęcia przedstawiają komórki śródbłonna wybarwione dwuocianem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propidyny (PI). a) zielony kolor - komórki żywe; b) czerwony kolor - komórki martwe.....	54
Ryc. 3-8 Na zdjęciach zaznaczono prostokątami miejsce wycinania próbki do testów mechanicznych w kierunku obwodowym A – dla naczyń, B – dla płatków oraz promieniowym C – dla naczyń, D – dla płatków.....	56
Ryc. 3-9 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym najdłuższym prostoliniowym odcinkiem ograniczonym punktami A, B oraz kątem nachylenia prostej do osi odkształcenia względnego.....	59
Ryc. 3-10 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym punktem M, przez który przeprowadzono prostą oraz kątem nachylenia tej prostej do osi odkształcenia względnego.....	60
Ryc. 3-11 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym punktem Y, przy którym naprężenie odpowiadało największej sile rozciągającej próbkę	61
Ryc. 3-12 Przykładowy wykres naprężenia od odkształcenia względnego z zaznaczonym polem powierzchni pod krzywą w punkcie Y, przy którym naprężenie odpowiadało największej sile rozciągającej próbkę.....	62
Ryc. 4-1 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych naczyń zastawki płucnej (n) wybarwione hematoksyliną i eozyną – A, B, C,D oraz błękitem alcjanowym – E, F, G. Na obrazie A – zaznaczono warstwową budowę naczynia <i>I – intima; M – media; A – adventita</i> . Kolejne litery alfabetu oznaczają A, B, E – tkanki natywne (Nn); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1n); D, G – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2n); (N=6)	69
Ryc. 4-2 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych płatków (p) zastawki płucnej wybarwione hematoksyliną i eozyną – A, B, C,D oraz błękitem alcjanowym – E, F, G. Na obrazie A – zaznaczono warstwową budowę naczynia <i>F – fibrosa; S – spongiosa; V – ventricularis</i> . Kolejne litery alfabetu oznaczają A, B, E – tkanki natywne (Np); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1p); D, G – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2p); (N=6).....	70
Ryc. 4-3 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych naczyń (n) zastawki płucnej	

wybarwione metodą Masson'a – A, B, C oraz metodą VEG – D, E, F. Kolejne litery alfabetu oznaczają: A, D – tkanki natywne (Nn); B, E – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1n); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2n); (N=6).....72

Ryc. 4-4 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych płatków (p) zastawki płucnej wybarwione metodą Masson'a – A, B, C oraz metodą VEG – D, E, F. Kolejne litery alfabetu oznaczają: A, D – tkanki natywne (Np); B, E – matryce po decelularyzacji metodą D1 (D1p); C, F – matryce po decelularyzacji metodą D2 (D2p); (N=6). 73

Ryc. 4-5 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych naczyń (D1n) zastawki płucnej przygotowanych metodą D1 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji metodą D1; B, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA1, C, G – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA2, D, H – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA3 (N=6). 75

Ryc. 4-6 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych naczyń (D2n) zastawki płucnej przygotowanych metodą D2 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji metodą D2; B, F – matryce po decelularyzacji metodą D2 sieciowane GA1, C, G – matryce po decelularyzacji metodą D2 sieciowane GA2, D, H – matryce po decelularyzacji metodą D2 sieciowane GA3 (N=6). 76

Ryc. 4-7 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych płatków (D1p) zastawki płucnej przygotowanych metodą D1 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji metodą D1; B, F – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA1, C, G – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA2, D, H – matryce po decelularyzacji metodą D1 sieciowane GA3 (N=6). 77

Ryc. 4-8 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych płatków (D2p) zastawki płucnej przygotowanych metodą D2 wybarwione według Masson'a. Obrazy A – D przedstawiają tkanki przed trawieniem enzymatycznym, E – H po trawieniu kolagenazą II. Kolejne litery oznaczają: A, E – matryce po decelularyzacji D2; B, F – matryce po decelularyzacji D2 sieciowane GA1, C, G – matryce po decelularyzacji D2 sieciowane GA2; D, H – matryce po decelularyzacji D2 sieciowane GA3 (N=6). 78

Ryc. 4-9 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych naczyń (D1n i D2n) oraz tkanek natywnych (Nn) zastawki płucnej wybarwione czerwieni alizarynową S. Obrazy A – E matryce po D1; F – J matryce po D2; K – O tkanki natywne. B, G, L – niesieciowane GA; C, H, M – sieciowane GA1; D, I, N – sieciowane GA2; E, J, O – sieciowane GA3. A, F, K; tkanki przed kalcyfikacją; B – E; G – J; L – O; tkanki po kalcyfikacji (N=6). 80

Ryc. 4-10 Przykładowe obrazy preparatów histologicznych decelularnych płatków (D1p i D2p) oraz tkanek natywnych zastawki płucnej (Np) wybarwione czerwieni alizarynową S. Obrazy A – E matryce po D1; F – J matryce po D2; K – O tkanki natywne. B, G, L – niesieciowane GA; C, H, M – sieciowane GA1; D, I, N – sieciowane GA2; E, J, O – sieciowane GA3. A, F, K; tkanki przed kalcyfikacją; B – E; G – J; L – O; tkanki po kalcyfikacji (N=6). 81

Ryc. 4-11 Przykładowe zdjęcia decelularnych naczyń (n) zastawki płucnej zasiedlone wtórnie komórkami śródbłonna. A – D tkanki poddane decelularyzacji metodą D1 (D1n); E – H tkanki poddane decelularyzacji metodą D2 (D2n). Kolejne litery oznaczają: A – kontrola D1n; E – kontrola D2n; B – D1n sieciowane GA1; F – D2n sieciowane GA1; C – D1n sieciowane GA2; G – D2n sieciowane GA2; D – D1n sieciowane GA3; H – D2n sieciowane GA3. Komórki żywe zabarwione na kolor zielony, martwe – czerwony, (N=6). 83

Ryc. 4-12 Przykładowe zdjęcia decelularnych płatków (p) zastawki płucnej zasiedlone wtórnie komórkami śródbłonna. A – D tkanki poddane decelularyzacji metodą D1 (D1p); E – H tkanki poddane decelularyzacji metodą D2 (D2p). Kolejne litery oznaczają: A – kontrola D1p; E – kontrola D2p; B – D1p sieciowane GA1; F – D2p sieciowane GA1; C – D1p sieciowane GA2; G – D2p sieciowane GA2; D – D1p sieciowane GA3; H – D2p sieciowane GA3. Komórki żywe zabarwione na kolor zielony, martwe – czerwony, (N=6). 84

Ryc. 4-13 Procent komórek martwych po 24h od ich zasiedlenia na decelularnych matrycach naczyń zastawki płucnej (n) w grupach D1n i D2n. D1n/D2n–kontrolne matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na matrycach z grupy D1n; A, B – wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na modyfikowanych matrycach z grupy D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek, pomiędzy wyróżnionymi typami decelularyzacji; test t-Studenta, $p < 0,05$; (N=6). 85

Ryc. 4-14 Procent komórek martwych po 24h od ich zasiedlenia na decelularnych matrycach płatków zastawki płucnej (p) w grupach D1p i D2p. D1p/D2p–kontrolne matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na matrycach z grupy D1p; A, B – wskazują różnice istotne statystycznie w procencie komórek martwych na modyfikowanych matrycach z grupy D2p; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek, pomiędzy wyróżnionymi typami decelularyzacji; test t-Studenta, $p < 0,05$; (N=6). 86

Ryc. 4-15 Procent komórek żywych, apoptotycznych oraz martwych, które zostały poddane działaniu ekstraktów tkankowych ($x \pm SD$; $N=6$). K – kontrola, komórki hodowane w standardowym medium hodowlanym, E1 –ekstrakt pozyskany z matryc D1p/D1n; E1GA1 –ekstrakt pozyskany z matryc D1pGA1/D1nGA1; E1GA2 –ekstrakt pozyskany z matryc D1pGA2/D1nGA2; E1GA3 –ekstrakt pozyskany z matryc D1pGA3/D1nGA3; E2 – ekstrakt pozyskany z matryc D1p/D1n; E2GA1 –ekstrakt pozyskany z matryc D2pGA1/D2nGA1; E2GA2 –ekstrakt pozyskany z matryc D2pGA2/D2nGA2; E2GA3 –ekstrakt pozyskany z matryc D2pGA3/D2nGA3. a, b, c – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie ekstraktów pozyskanych z tkanek w grupie D1 (A); w obrębie ekstraktów pozyskanych z tkanek w grupie D2 (B); Test Tukeya, $p < 0,05$. W pkt C) * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup ekstraktów; test t-Studenta, $p < 0,05$ 88

Ryc. 4-16 Przykładowe zdjęcia komórek śródbłonna traktowanych poszczególnymi ekstraktami. Kolor zielony – filamenty aktynowe; kolor czerwony – filamenty pośrednie; kolor niebieski – jądra komórkowe. A – kontrola (K), komórki hodowane w standardowym medium hodowlanym; B – komórki traktowane E1; C – komórki traktowane E1GA1; D – komórki traktowane E1GA2; E – komórki traktowane E1GA3; F – komórki traktowane E2; G – komórki traktowane E2GA1; H – komórki traktowane E2GA2; I – komórki traktowane E2GA3; ($N=6$). (Wyjaśnienie oznaczeń ekstraktów rozdział 3.11.1; Tab. 3 – 2)..... 90

Ryc. 4-17 Średnie stężenie IL6 [$x \pm SD$, $N=6$; $pg \cdot mL^{-1}$] wydzielonej przez komórki, hodowane w obecności ekstraktów tkankowych. K – kontrola, komórki które hodowano w standardowym medium hodowlanym, E1 – komórki hodowane z ekstraktem pozyskanym z matryc D1p/D1n; E1GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D1pGA1/D1nGA1; E1GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D1pGA2/D1nGA2; E1GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D1pGA3/D1nGA3; E2 – komórki hodowane pozyskanym z matryc D2p/D2n; E2GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D2pGA1/D2nGA1; E2GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D2pGA2/D2nGA2; E2GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D2pGA3/D2nGA3. a, b, c – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D1; A, B, C - wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D2; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup, pomiędzy metodami decelularyzacji tkanki; test t-Studenta, $p < 0,05$ 91

Ryc. 4-18 Średnie stężenie IL8 [$x \pm SD$, $N=6$; $pg \cdot mL^{-1}$] wydzielonej przez komórki, hodowane w obecności ekstraktów tkankowych. K – kontrola, komórki które hodowano w standardowym medium hodowlanym, E1 – komórki hodowane z ekstraktem pozyskanym z matryc D1p/D1n; E1GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc

D1pGA1/D1nGA1; E1GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D1pGA2/D1nGA2; E1GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D1pGA3/D1nGA3; E2 – komórki hodowane pozyskanym z matryc D2p/D2n; E2GA1 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D2pGA1/D2nGA1; E2GA2 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D2pGA2/D2nGA2; E2GA3 – komórki traktowane ekstraktem pozyskanym z matryc D2pGA3/D2nGA3. a, b, c – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D1; A, B, C – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie decelularyzacji metodą D2; Test Tukeya, $p < 0,05$. * – zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup, pomiędzy metodami decelularyzacji tkanki; test t-Studenta, $p < 0,05$ 92

Ryc. 4-19 Odkształcenie względne [%] dla fragmentów naczyń (n) zastawki płucnej badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n /D2n–matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1n natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2n; Test Tukey $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta $p < 0,05$ 93

Ryc. 4-20 Odkształcenie względne [%] dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np –tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek po D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek po D2p; Test Tukeya $p < 0,05$.* - zaznaczono różnice istotne statystycznie między D1p a D2p w obrębie komplementarnych grup tkanek; test t-Studenta $p < 0,05$ 94

Ryc. 4-21 Wartość modułu elastyczności ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między grupami D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$ 95

Ryc. 4-22 Wartość modułu elastyczności ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1p natomiast A, B, C, D

– w obrębie tkanek w grupie D2p; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1 a D2; test t-Studenta, $p < 0,05$ 96

Ryc. 4-23 Wartość modułu siecznego ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$ 97

Ryc. 4-24 Wartość modułu siecznego ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów płatków (p) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$ 98

Ryc. 4-25 Wartość wytrzymałości na rozciąganie ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$ 99

Ryc. 4-26 Wytrzymałości na rozciąganie ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$ 100

Ryc. 4-27 Wartość energii (E) w punkcie maksymalnego naprężenia ($x \pm SD$; J · cm⁻²) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d– wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n

natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$ 101

Ryc. 4-28 Wartość energii (E) w punkcie maksymalnego naprężenia ($x \pm SD$; $J \cdot cm^{-2}$) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$ 102

Ryc. 4-29 Wartość naprężenia w momencie zerwania ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów naczyń (n) badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Nn – tkanki natywne; D1n/D2n –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b, c, d- wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek w grupie D1n natomiast A, B, C, D – w obrębie tkanek w grupie D2n; Test Tukeya, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1n a D2n; test t-Studenta, $p < 0,05$ 103

Ryc. 4-30 Wartość naprężenia w momencie zerwania ($x \pm SD$; MPa) dla fragmentów płatków (p) zastawek badanych w kierunku obwodowym (A) oraz w kierunku promieniowym (B). Np – tkanki natywne; D1p/D2p –matryce decelularne, GA1 - matryce sieciowane 0,0125% GA; GA2 – matryce sieciowane 0,025% GA; GA3 - matryce sieciowane 0,05% GA. a, b – wskazują różnice istotne statystycznie w obrębie tkanek z grupy D1p natomiast A, B – w obrębie tkanek z grupy D2p; Test Tukey, $p < 0,05$. * - zaznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie komplementarnych grup tkanek między D1p a D2p; test t-Studenta, $p < 0,05$ 104

10 SPIS TABEL

Tab. 3-1 Wyróżnione grupy badawcze. W tabeli znakiem „x” oznaczono włączenie grupy do danego eksperymentu.	39
Tab. 3-2 Oznaczenia ekstraktów i rodzaj tkanki, z której ekstrakt został pozyskany	49
Tab. 3-3 Skład roztworów użytych w eksperymentach.	64
Tab. 3-4 Wykaz odczynników stosowanych w eksperymentach.	66
Tab. 4-1 Wyniki analizy wariancji zmian wartości parametrów opisujących wybrane właściwości biomechaniczne decelularnych i modyfikowanych GA tkanek naczyń zastawki płucnej.....	105
Tab. 4-2 Wyniki analizy wariancji zmian wartości parametrów opisujących wybrane właściwości biomechaniczne decelularnych i modyfikowanych GA tkanek płatków zastawki płucnej.....	106

11 WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

ADSC	Komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (<i>ang. adipose-derived stem cells</i>)
AF-MSC	Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z płynu owodniowego (<i>ang. mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid</i>)
ALB	Barwienie z użyciem błękitu alcjanowego (<i>ang. alcian blue staining</i>)
aVIC	Aktywowane komórki interstycjalne (<i>ang. activated interstitial cells</i>)
BHV	Biologiczna proteza zastawki serca (<i>ang. bioprosthetic heart valves</i>)
BM-MSC	Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (<i>ang. bone marrow mesenchymal stem cells</i>)
BP	Osierdzie bydlęce (<i>ang. bovine pericardium</i>)
CHAPS	3 - [(3-cholamidopropyl) dimetyloamonio] -1-pro- panesulfonian (<i>ang. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>)
CV-MSC	Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z kosmówki (<i>ang. chorionic villi mesenchymal stem cells</i>)
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
DNAza	Deoksyrybonukleaza (<i>ang. deoxyribonuclease</i>)
DPX	Ftalan dibutyli rozpuszczony w ksylenie (<i>ang. dibutyl phthalate in xylene</i>)
EC	Komórki śródbłónka (<i>ang. endothelial cells</i>)
ECM	Macierz zewnątrzkomórkowa (<i>ang. extracellular matrix</i>)
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy (<i>ang. ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	Epidermalny czynnik wzrostu (<i>ang. epidermal growth factor</i>)
EGTA	kwas tetraoctowy glikolu etylenowego (<i>ang. glycol ether diamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Test immunoenzymatyczny (<i>ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMT	Przejście epithelialno-mezenchymalne (<i>ang. epithelial-mesenchymal transition</i>)
EPC	Endotelialne komórki progenitorowe (<i>ang. endothelial progenitor cell</i>)
ES	Embrionalne komórki macierzyste (<i>ang. embryonic stem cells</i>)
eVIC	Interstycjalne komórki progenitorowe śródbłónka/mezenchymalne (<i>ang. embryonic progenitor endothelial/mesenchymal interstitial cells</i>)
FDA	Diocetan fluoresceiny (<i>ang. fluorescein diacetate</i>)

FGF	Czynniki wzrostu fibroblastów (<i>ang. fibroblast growth factor</i>)
FITC	Izotiocyanian fluoresceiny (<i>ang. fluorescein isothiocyanate</i>)
GA	Aldehyd glutarowy (<i>ang. glutaraldehyde acin</i>)
GAG	Glikozaminoglikany (<i>ang. glycosaminoglycans</i>)
HE	Barwienie hematoksyliną i eozyną (<i>ang. hematoxylin and eosin staining</i>)
HP	Ludzkie osierdzie (<i>ang. human pericardium</i>)
HUVEC	Ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej (<i>ang. human umbilical endothelial cells</i>)
IGF-1	Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (<i>ang. Insulin-like growth factor 1</i>)
IL-6	Interleukina 6 (<i>ang. interleukin 6</i>)
IL-8	Interleukina 8 (<i>ang. interleukin 8</i>)
iPS	Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (<i>ang. Induced pluripotent stem cells</i>)
MHC	Główny układ zgodności tkankowej (<i>ang. major histocompatibility complex</i>)
MHV	Proteza mechaniczna zastawki serca (<i>ang. mechanical heart valves</i>)
MMPs	Metaloproteinazy (<i>ang. matrix metalloproteinases</i>)
Ms	Moduł sieczny (<i>ang. secant modulus</i>)
MSC	Mezenchymalne komórki macierzyste (<i>ang. mesenchymal stem cell</i>)
MY	Moduł elastyczności; moduł Younga (<i>ang. Young modulus</i>)
obVIC	Osteoblastyczne komórki interstycjalne (<i>ang. osteoblastic interstitial cell</i>)
PBS	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PCL	poli (kaprolakton) (<i>ang. polycaprolactone</i>)
PE	Fikoerytryna (<i>ang. phycoerythrin</i>)
PEG	Poli(glikol etylenowy) (<i>ang. polyethylene glycol</i>)
PGA	Poli (kwas glikolowy) (<i>ang. poly(glycolic acid)</i>)
PGG	1,2,3,4,6-Penta-O-galloilo-beta-D-glukoza (<i>ang. 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose</i>)
PI	Jodek propidyny (<i>ang. propidium iodide</i>)
PLA	Poli (kwas mlekowy) (<i>ang. poly(lactic acid)</i>)
PMSF	Fluorek fenylometylosulfonylu (<i>ang. phenyl- methanesulfonyl fluorid</i>)
PVA	Alkohol poliwinylowy (<i>ang. Poly(vinyl alcohol)</i>)
pVIC	Dojrzałe progenitorowe komórki interstycjalne (<i>ang. adult, progenitor interstitial cells</i>)

qVIC	uśpione komórki interstycjalne (<i>ang. quiescent interstitial cells</i>)
RNA	Kwasy rybonukleinowy (<i>ang. ribonucleic acid</i>)
RNAza	Rybonukleaza (<i>ang. Ribonuclease</i>)
SDC	Deoksycholan sodu (<i>ang. sodium deoxycholate</i>)
SDS	Dodecylosiarczan sodu (<i>ang. sodium dodecyl sulfate</i>)
TEHV	Inżynieria tkankowa zastawki serca (<i>ang. tissue engineering heart valve</i>)
TFPI	Inhibitor zależny od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (<i>ang. tissue factor pathway inhibitor</i>)
TGF- β	Transformujący czynnik wzrostu β (<i>ang. transforming growth factor β</i>)
TIMPs	Tkankowe inhibitory metaloproteinaz (<i>ang. tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
UC-MSC	Pępowinowe mezenchymalne komórki macierzyste (<i>ang. umbilical cord-derived mesenchymal stem cells</i>)
VCAM-1	Cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (<i>ang. vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VEC	Naczyniowe komórki śródbłónka (<i>ang. vascular endothelial cells</i>)
VEG	Barwienie metodą Verhoeff-van Giesona (<i>ang. Verhoeff-van Gieson staining</i>)
VEGF	Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>)
VIC	Naczyniowe komórki śródmiąższowe (<i>ang. vascular interstitial cells</i>)
α - Gal	Galaktoza- α -1,3-galaktoza (<i>ang. galactose-alpha-1,3-galactose</i>)